

CONTROL HORMONAL DE LA REPRODUCCIÓN EN PECES

José Antonio Muñoz Cueto

Departamento de Biología. Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales. Universidad de Cádiz. Polígono Río San Pedro. 11510-Puerto Real, Cádiz. España.

Telefono: +34-956016023
Fax: +34-956016019
E-mail: munoz.cueto@uca.es

1.- INTRODUCCIÓN

La investigación biológica ha dedicado notables esfuerzos y recursos al estudio de la reproducción sexual, ya que este fenómeno cíclico permite la transmisión de la información genética de unas generaciones a otras, la existencia de la diversidad biológica, así como la perpetuación de las especies. Para que la reproducción tenga éxito es preciso que se produzca una sincronización de los reproductores entre sí y de éstos con las variaciones de los factores ambientales. Esta sincronización permitirá que los individuos maduren simultáneamente y en el momento más idóneo para garantizar una mayor supervivencia de la progenie (Carrillo y Zanuy, 1993). Esta sincronización de los individuos con los factores ambientales resulta de gran importancia en el ciclo reproductivo de los peces teleósteos, que presentan cambios cíclicos en sus niveles hormonales y viven en un medio que experimenta marcadas variaciones estacionales en factores tales como la luz, la temperatura, el oxígeno disuelto, la salinidad, el pH, la disponibilidad de nutrientes, etc. Así, cada individuo debe disponer de un sistema que reciba las informaciones procedentes tanto del exterior como del interior del organismo, que las integre y determine el establecimiento de un estado endocrino idóneo que regule, a su vez, todos los eventos fisiológicos que conducirán a la reproducción. Estas complejas funciones se llevan a cabo a través de múltiples interacciones que tienen lugar a lo largo del **eje cerebro-hipófisis-gónada** (Kah et al., 1993).

La hipófisis desempeña un papel crucial en el control del proceso reproductivo, ya que sintetiza y secreta las gonadotrofinas, unas hormonas de naturaleza glicoproteica que dirigen el desarrollo gametogénico y la secreción de esteroides en las gónadas. En Tetrápodos, las gonadotrofinas están representadas por dos moléculas: la hormona luteinizante (LH) y la hormona estimulante del folículo (FSH), a las que hay que añadir en Mamíferos una tercera gonadotrofina de origen placentario o gonadotrofina coriónica (GC). En peces ha existido controversia sobre la dualidad de las gonadotrofinas, si bien hoy está clara la presencia de dos moléculas con acción gonadotropa, denominadas GTH I o vitelogénica y GTH II o maduracional, según sus funciones en el ciclo reproductivo. Actualmente se acepta que la GTH I de peces se corresponde con la FSH de tetrápodos, mientras que la GTH II se corresponde con la LH (Querat et al., 2000). Podemos decir, en general, que la gametogénesis en el ovario y el testículo, dependen de la acción de las gonadotrofinas. Esta acción está mediada por la unión de las mismas a receptores situados en la membrana de ciertas células de las gónadas e implica la activación de la ruta de síntesis y secreción de diferentes esteroides sexuales. Así, tanto los ovarios como los testículos de teleósteos son capaces de producir varios tipos de esteroides (estrógenos o esteroides C₁₈, andrógenos o esteroides C₁₉ y progestinas o esteroides C₂₁) según el momento del ciclo y en respuesta a cada tipo de gonadotrofina. Los esteroides son capaces de actuar sobre el hígado, sobre la propia gónada, sobre la hipófisis y el cerebro en un circuito de retroalimentación (Nagahama, 1994).

El sistema nervioso central desempeña un papel relevante en el control de la reproducción bajo dos aspectos fundamentales: en primer lugar es el encargado de integrar las señales externas (luz, temperatura, salinidad, nutrientes, factores sociales, etc) e internas (hormonales) y, en segundo lugar, debe transmitir las señales a los efectores endocrinos, a través de una acción

moduladora sobre la actividad de la hipófisis. Existen numerosos estudios sobre los mecanismos centrales de control de la reproducción de peces teleósteos, tanto en sus aspectos fisiológicos como anatómicos. Estos conocimientos están recogidos en las revisiones realizadas por Peter et al. (1991), Kah et al. (1993) y Trudeau (1997). Los estímulos sociales (presencia de otros individuos, densidad de población, proporción de sexos, etc.) y ambientales (temperatura, fotoperíodo, salinidad, nutrientes, etc.) son captados por sistemas sensoriales específicos y transmitidos al sistema nervioso central (SNC). Este sistema responde por medio de circuitos neuronales precisos, mediante la liberación de determinadas neurohormonas que regulan la actividad de la hipófisis. En teleósteos, a falta de un sistema diferenciado portal hipotálamo-hipofisario similar al existente en Tetrápodos, estas neurohormonas llegan a la hipófisis a través de una inervación más o menos directa de las células del lóbulo anterior adenohipofisario. La hipófisis, en respuesta a estos factores neuroendocrinos, sintetiza y secreta gonadotrofinas, que regulan a su vez diferentes aspectos del desarrollo, el crecimiento y la esteroidogénesis gonadal, así como otros procesos implicados en la reproducción.

Las *gonadoliberinas* (GnRHs) constituyen una familia de moléculas peptídicas cerebrales cuya naturaleza y diversidad está bastante estudiada en peces teleósteos, ya que representan el principal factor liberador de las gonadotrofinas hipofisarias (Breton et al. 1972; King y Millard, 1992; Sherwood et al., 1993; Lethimonier et al., 2004). Las GnRHs, producidas en neuronas presentes en diferentes áreas del cerebro, acceden a la hipófisis de los teleósteos a través de las citadas conexiones neuronales directas. Su interacción con receptores específicos, situados en la membrana de las células gonadotropas y acoplados a diversos sistemas de segundos mensajeros, estimula la síntesis y secreción de las gonadotrofinas (Hazum y Conn, 1988; Chang et al., 2000).

No obstante, la actividad hipofisaria no sólo está regulada por las GnRHs, sino que existen otros factores cerebrales que estimulan o inhiben esta actividad (Peter et al., 1991; Kah et al., 1993; Trudeau et al., 1997; Yaron et al., 2003). Así, se ha descrito la existencia de un *factor inhibidor de la liberación de gonadotrofinas*, que se ha identificado como la dopamina, y de otras moléculas que intervienen en esta regulación, como ciertos neuropéptidos (péptidos opioides, neuropéptido Y, galanina, colecistoquinina, polipéptido activador de la adenilil ciclasa de pituitaria o PACAP), monoaminas (noradrenalina, serotonina) y aminoácidos neurotransmisores (ácido γ -aminobutírico o GABA, taurina, ácido glutámico, ácido aspártico, alanina).

La Acuicultura tiene como objetivos básicos la reproducción de las especies de mayor interés socio-económico, la supervivencia y la mejora de la calidad de la progenie. En la práctica, esta actividad supone el mantenimiento de los peces en condiciones de cautividad, con el objeto de comercializarlos para su consumo o con la intención de incrementar su producción por encima de los niveles obtenidos en el medio natural. El cultivo intensivo de peces introduce, en la mayoría de los casos, variaciones respecto a las condiciones en las que se encuentran las poblaciones naturales, provocando alteraciones en su ciclo reproductivo. De hecho, numerosas especies no se reproducen durante el primer año en cautividad, probablemente por la falta de síntesis y/o liberación de gonadotrofinas en este período y otras no lo llegan a hacer nunca (Matsuyama et al., 1991). Por tanto, el conocimiento de los mecanismos que regulan la función reproductora de estas especies de interés económico es un

requisito indispensable para el desarrollo de la Acuicultura. Una vez adquiridos los conocimientos necesarios sobre el proceso reproductor y su regulación en una especie determinada es posible controlar en cierta medida las distintas etapas de la reproducción.

2.- LA HIPÓFISIS DE TELEÓSTEOS Y LA PRODUCCION DE GONADOTROFINAS

2.1.- Introducción

La hipófisis está presente en todos los vertebrados y se encuentra situada en la base del III ventrículo, alojada en la silla turca (Van Oordt y Peute, 1983). En vertebrados, la hipófisis consta de una porción nerviosa, la *neurohipófisis*, constituida por axones de células neurosecretoras que proyectan a la hipófisis y de una porción endocrina, la *adenhipófisis*, constituida por células secretoras no nerviosas. La neurohipófisis deriva del suelo del infundíbulo, mientras que la adenhipófisis se origina por formación de una placoda en el techo del ectodermo bucal. La neurohipófisis se puede dividir en tres regiones: el *tallo neural*, el *lóbulo neural* y la *eminencia media*. La eminencia media está en contacto con la *pars distalis* de la adenhipófisis mediante vasos sanguíneos que transportan las neurosecreciones desde el cerebro hasta la adenhipófisis. Sin embargo, la eminencia media no está presente en peces teleósteos, por lo cual las neurosecreciones que controlan la actividad de las células adenhipofisarias penetran directamente hasta la *pars distalis* y vierten su contenido en el entorno de sus células diana. Esta inervación directa de la adenhipófisis característica de peces ha sido gran utilidad para dilucidar qué factores cerebrales tienen actividad hipofisiotrófica, ya que éstos pueden ser detectados en fibras presentes en el entorno del tipo celular cuya actividad están regulando.

El *lóbulo neural* también posee vasos sanguíneos que no suelen contactar con la adenhipófisis. La adenhipófisis se divide normalmente en dos regiones: la *pars intermedia* (PI), en aposición al tejido nervioso neurohipofisario, que contiene las células melanotropas (MSH), y la *pars distalis* (PD), que constituye, generalmente, la parte mayor y más compleja de la adenhipófisis, y que contiene las células lactotropas (PRL), corticotropas (ACTH), gonadotropas (FSH, LH), somatotropas (GH) y tiotropas (TSH). En peces teleósteos, la *pars distalis* se divide en dos regiones: una porción rostral (*pars distalis rostral*, PDR), que contiene mayoritariamente las células lactotropas y corticotropas y una porción proximal (*pars distalis proximal*, PDP), donde se localizan las células gonadotropas, somatotropas y tiotropas.

Las hormonas secretadas por la *neurohipofisis* son péptidos de 9 aminoácidos, si bien se denominan octapéptidos porque las dos cisteínas existentes se encuentran unidas por un puente disulfuro formando una molécula de cistina. Estos péptidos son sintetizados por células neurosecretoras del hipotálamo anterior, almacenándose en gránulos neurosecretorios en forma de prohormona, unidos a glicoproteínas y a unas proteínas transportadoras denominadas *neurofisinas*. En teleósteos, dentro de estos péptidos neurohipofisarios se distinguen péptidos básicos como la arginina vasotocina y péptidos neutros como la isotocina, según tengan aminoácidos básicos o neutros en la posición 8.

Las hormonas de la adenohipófisis pueden ser agrupadas en tres familias: un primer grupo está constituido por las *hormonas tróficas*, es decir, la hormona de crecimiento (GH) y la prolactina (PRL), al parecer derivadas de una molécula ancestral común. En peces teleósteos se ha identificado una nueva hormona hipofisaria, la somatolactina, que se expresa en células de la *pars intermedia*, y que parece estar relacionada con estas hormonas tróficas, al menos en su secuencia, pero cuya presencia no ha sido detectada aún en otros vertebrados (Rand-Weaver et al., 1992). El segundo grupo lo componen las hormonas derivadas de la proopiomelanocortina (POMC), que son la MSH (hormona melanoestimulante) y la ACTH (hormona adenocorticotropa), producidas por ruptura enzimática de la POMC. Por último, las *hormonas glicoprotéicas*, grupo que comprende a la TSH (hormona estimulante del tiroides) y a las gonadotrofinas. Las funciones de estas hormonas están bastante caracterizadas en Tetrápodos y en Peces: la PRL está relacionada con el crecimiento, la osmorregulación y la reproducción. La GH se relaciona con el crecimiento, el desarrollo y el metabolismo. La somatolactina, cuyas funciones aún no están bien descritas, podría jugar un papel en la reproducción de los peces ya que se observan incrementos de somatolactina en época de recrudescencia gonadal y muestra actividad esteroidogénica (Rand-Weaver et al., 1992). La ACTH estimula la producción de corticosteroides, mientras que la MSH está implicada en la melanogénesis y en la dispersión de la melanina. La TSH estimula la glándula tiroides, influyendo en la captación de iones y en la síntesis de hormonas tiroideas (Gorbman et al., 1983). La acción fisiológica de las hormonas gonadotropas será considerada en detalle a continuación.

2.2.-Las gonadotrofinas

Las gonadotrofinas son las hormonas que regulan la gametogénesis y la esteroidogénesis gonadal (Swanson, 1991). Como se introdujo en el primer capítulo de esta revisión, si bien existen varias hormonas capaces de influir sobre algún aspecto de la función gonadal, en Tetrápodos, el término "gonadotrofinas" se aplica únicamente a las glicoproteínas sintetizadas por la hipófisis: la hormona estimulante del folículo o folitropina (FSH) y la hormona luteinizante o lutropina (LH). En Mamíferos, existe una tercera glicoproteína de origen placentario denominada gonadotrofina coriónica (CG) (Pierce y Parsons, 1981). La LH y la FSH cumplen papeles diferentes en el ciclo sexual de Tetrápodos. De la LH dependen los procesos de ovulación y secreción de esteroides gonadales, especialmente de progesterona en el ovario y de andrógenos en el testículo. A la FSH se le asigna una acción estimuladora del desarrollo folicular temprano y de la preparación de las gónadas para las acciones posteriores de la LH. En teleósteos también se ha descrito la existencia de dos GTHs, GTH I y GTH II, análogas a la FSH y a la LH, respectivamente (Suzuki et al., 1988a, b, c, d; Swanson, 1991, Querat et al., 2000).

2.2.1.- Bioquímica de las gonadotrofinas

Los estudios bioquímicos y fisiológicos de las gonadotrofinas en muchas especies de teleósteos se han visto limitados por el elevado número de hipófisis necesario para llevar a cabo la purificación de las gonadotrofinas, así como por la falta de bioensayos sensibles y específicos que permitan corroborar la pureza de las gonadotrofinas obtenidas (Copeland y Thomas,

1992). Las gonadotrofinas de Peces se han obtenido usando métodos similares a los empleados para las gonadotrofinas de Mamíferos, tales como cromatografía, electroforesis, HPLC, etc.

En la década de los 50, se intentaron aislar y purificar las gonadotrofinas de diversas especies de peces y se realizaron los primeros ensayos biológicos (Otsuka, 1956; Robertson y Rinfret, 1957). Estos estudios continuaron en la década de los 60 (Burzawa-Gérard y Fontaine, 1966; Breton, 1968), pero no fue hasta 1971 cuando Burzawa-Gérard obtuvo una gonadotrofina de carpa, *Cyprinus carpio*, L., altamente purificada y realizó con ella ensayos biológicos de espermiación en rana (Burzawa-Gérard, 1971). A la purificación de la gonadotrofina de carpa ha seguido la de numerosas especies de teleósteos (Suzuki et al., 1988a; Kawachi et al., 1989; Koide et al., 1993).

A diferencia de los Tetrápodos, en varias especies de peces se estableció inicialmente la existencia una sola gonadotrofina, análoga a la LH que parecía controlar todos los aspectos del desarrollo de las gónadas, de la maduración y de la ovulación- espermiación, sin encontrarse una segunda molécula homóloga a la FSH (Burzawa-Gerard y Fontaine, 1972; Donaldson et al., 1972; Farmer y Papkoff, 1977). Sin embargo, muchos autores mostraron que los niveles de esa única gonadotrofina "maduracional", si bien eran elevados en el periodo de puesta, eran bajos e incluso no detectables en el período de recrudescencia gonadal (Breton y Billard, 1977; Copeland y Thomas, 1989 y 1992).

La existencia de dos gonadotrofinas químicamente diferentes, fue propuesta en primer lugar por Idler y sus colaboradores en salmón (*Oncorhynchus tshawytscha*), platija (*Hippoglossoides platessoides*) y lenguado americano (*Pseudopleuronectes americanus*) (Idler et al, 1975; Ng e Idler, 1978a, b; Ng e Idler, 1979). Estos autores, denominaron gonadotrofina gonadotropina vitelogénica o gonadotropina pobre en carbohidratos (GTH-CP, "carbohydrate poor") a la fracción hipofisaria no absorbida por la columna de afinidad en Concanavalina-A, y gonadotropina maduracional o gonadotropina rica en carbohidratos (GTH-CR, "carbohydrate rich") a la fracción absorbida por la columna. La fracción GTH-CP, descrita para platija y lenguado, presentaba dos formas con pesos moleculares muy diferentes, 28 Kd y 62 Kd, que fueron consideradas como formas pequeña ("Little") y grande ("Big"), respectivamente. Ambas formas resultaron activas estimulando el crecimiento ovárico y la vitelogénesis, pero inactivas en la inducción de la maduración y la ovulación (Ng e Idler, 1978a; Ng e Idler, 1979). Los mismos autores señalaron la posibilidad de que la forma grande correspondiera a agregados moleculares con actividad biológica. Asimismo, estos autores apoyaron la dualidad química y fisiológica de las gonadotrofinas de teleósteos con diferentes ensayos biológicos, que sugerían la implicación de la GTH-CP en la vitelogénesis y de la GTH-CR en la esteroidogénesis y la maduración (Campbell e Idler, 1976, 1977; Ng e Idler, 1978a,b). No obstante, se observó un solapamiento en las acciones de ambas fracciones hipofisarias, presentando la GTH-CR o maduracional capacidad para estimular tanto la maduración y la ovulación como la vitelogénesis (Ng e Idler, 1979). Resulta necesario señalar que la utilización de fracciones obtenidas a partir de cromatografías en Concanavalina-A presenta algunas limitaciones a la hora de separar las dos gonadotrofinas, ya que las variaciones que sufren los dominios glicosilados de las gonadotrofinas pueden alterar su afinidad por la Concanavalina-A, su

actividad biológica y la afinidad por sus receptores (Van der Kraak y Peter, 1987).

Empleando técnicas alternativas a las de Idler y colaboradores, así como técnicas de clonación molecular, otros investigadores han demostrado posteriormente la existencia de dos gonadotrofinas, FSH y LH, en numerosos grupos de peces teleósteos. Así, a partir de 1986, se han identificado dos gonadotrofinas diferentes en anguiliformes (*Anguilla japonica*), salmóniformes (*Oncorhynchus keta*, *O. rhodurus* y *O. kisutch*, *O. mikiss*, *O. tshawytscha*), cipríniformes y ciprinodóntiformes (*Cyprinus carpio*, *Ctenopharyngodon idell*, *Fundulus heteroclitus*), gasterosteoiformes (*Gasterosteus aculeatus*), perciformes (*Micropogonias undulatus*, *Katsuwonus pelamis*, *Thunnus obesus*, *Sparus aurata*, *Seriola dumerilii*, *Dicentrarchus labrax*) o pleuronectiformes (*Paralichthys olivaceus*, *Hippoglossus hippoglossus*) (Suzuki et al., 1988a, b; Yu y Shen, 1989; Swanson et al., 1991; Lin et al., 1992; Koide et al., 1993; Copeland y Thomas, 1993; Okada et al., 1994; García-Hernández et al., 1994; Elizur et al., 1996; Kajimura et al., 2001; Mateos et al., 2003; Han et al., 2003; Weltzien et al., 2003; Hellqvist et al., 2004).

Al igual que en Tetrápodos, las gonadotrofinas de Peces son heterodiméricas, es decir, están formadas por dos subunidades distintas, α y β , unidas entre sí de forma no covalente. La caracterización de las dos subunidades, su secuenciación completa y el desarrollo de anticuerpos específicos permitió determinar que, estas subunidades, difieren notablemente tanto en su peso molecular, como en su secuencia de aminoácidos y en su conservación filogenética (Suzuki et al., 1988c; Itoh et al., 1988, 1990; Kawauchi et al., 1989, 1991; Koide et al., 1993). En la mayoría de los casos, la subunidad α es común en la FSH y la LH, y presenta un alto grado de conservación interespecífica. Sin embargo, en el caso de una especie de salmon, las subunidades α de las dos gonadotrofinas también presentan secuencias polipeptídicas distintas (Itoh et al., 1990). En cambio, la subunidad β , presenta notables diferencias entre la FSH y la LH, y es la que confiere la especificidad hormonal (Koide et al., 1993). De hecho, las subunidades β muestran menos homologías intraespecíficas que interespecíficas. Así, la β FSH I y la β LH de bonito presentan solamente un 22% de homología entre sí, mientras que la β FSH de bonito presenta un 43% de homología con la β LH de bovino; las β LH de diferentes salmónidos presentan en torno a un 97% de homología (Kawauchi et al., 1991; Koide et al., 1993).

La dualidad de las gonadotrofinas en teleósteos es, pues, una realidad tanto desde el punto de vista bioquímico, fisiológico como inmunológico (ver apartado siguiente). Sin embargo, los primeros datos aportados, que hacían referencia a dos gonadotrofinas, una "vitelogénica" o pobre en carbohidratos y una "maduracional" o rica en carbohidratos, no son coincidentes con los aportados por el grupo de Kawauchi, citados anteriormente. Estos autores consideran la existencia de una GTH I (FSH), más abundante durante la etapa vitelogénica, pero que al igual que la GTH II (LH), que se correspondería con la gonadotrofina maduracional, posee un marcado carácter glicoproteico (Kawauchi et al., 1991; Swanson, 1991).

La porción glicosídica desempeña también un importante papel en la actividad biológica de las gonadotrofinas. En peces, se han descrito hasta 11 oligosacáridos diferentes en esta porción glucosídica, siendo la mayoría hexosas o sus derivados simples, como la N-acetilhexosamina y los ácidos

urónicos. Se han identificado también azúcares más complejos como los ácidos siálicos, derivados del ácido neuramínico. La unión entre los carbohidratos y los aminoácidos se lleva a cabo de dos formas: por enlaces N-glicosídicos entre el carbono anomérico de la N-acetilgalactosamina y por enlaces O-glicosídicos entre N-acetilgalactosamina, galactosa y/o xilosa y los grupos hidroxilo de la Serina, Treonina, Hidroxilisina e Hidroxiprolina (Kobata, 1992; Amano y Kobata, 1993).

2.2.2.- Localización de las células gonadotropas: síntesis y secreción de las gonadotrofinas

Las células productoras de gonadotrofinas se han localizado en la hipófisis de numerosas especies de teleósteos, mediante estudios inmunocitoquímicos a nivel óptico y electrónico (Olivereau y Nagahama, 1983; Van Oordt y Peute, 1983; Cambre et al., 1986; Quesada et al., 1988; García-García, 1993). La distribución de las células gonadotropas no presenta grandes diferencias interespecíficas, localizándose sobre todo en la *pars distalis proximal* (PPD) y, en ocasiones, en la *pars intermedia* (PI).

Sin embargo, existe cierta controversia sobre la existencia de uno o dos tipos de células gonadotropas. En salmónidos, los estudios realizados a microscopía óptica por Olivereau (1978) evidenciaron dos tipos de células gonadotropas que difieren en su localización en la PPD y en la síntesis de gonadotrofinas a lo largo del ciclo reproductivo. En algunos estudios ultraestructurales se utilizan los términos de gonadotropos globulares y vesiculares para referirse a estos dos tipos celulares (Ueda e Hirashima, 1979), mientras que para otros autores no representan más que distintas fases de actividad de un mismo tipo celular (Peute et al., 1978). Estudios inmunocitoquímicos posteriores, a nivel óptico y electrónico, mostraron que la FSH y la LH eran producidas en dos tipos distintos de gonadotropos de la PPD (Nozaki et al., 1990a; Naito et al., 1993). En la trucha arcoiris, las células LH se localizan en las regiones centrales de los cordones glandulares de la PPD, mientras que las células FSH se distribuyen en su periferia. Esta ausencia de colocalización celular de FSH y LH parece diferenciar la hipófisis de peces respecto a la de otros vertebrados superiores, en los que coexisten FSH y LH en la misma célula (Swanson, 1991).

La aparición de dos gonadotrofinas durante el desarrollo ontogénico, también ha sido puesta de manifiesto mediante técnicas inmunocitoquímicas (Nozaki et al., 1990b; Naito et al., 1991; Swanson et al., 1989; Saga et al., 1993). Así, en el salmón coho y en la trucha arcoiris, las células FSH positivas aparecen en las etapas larvarias, mientras que las células LH inmunoreactivas no se detectan en ninguna etapa del desarrollo larvario. Es importante señalar que la aparición de la FSH coincide con el momento en que tiene lugar la determinación morfológica gonadal, lo que induce a pensar que la FSH, y no la LH, está implicada en la determinación sexual y en el crecimiento inicial de las gónadas (Swanson, 1991). En salmónidos, durante el período juvenil y prepuberal, los niveles de FSH en la hipófisis son unas 200 veces mayores que los de LH, mientras que en el plasma sólo resultan detectables los niveles de FSH (Swanson et al., 1989). No obstante, las gónadas son capaces de responder a ambas gonadotrofinas en esta etapa (Swanson, 1991).

La expresión y los niveles de ambas gonadotrofinas en el plasma y la hipófisis de teleósteos también varían a lo largo del ciclo reproductivo, como se ha puesto de manifiesto en diversas especies (Suzuki et al., 1988d; Swanson,

1991; Yaron et al., 2003). Mediante estudios inmunocitoquímicos, Nozaki et al., (1990b) pusieron de manifiesto que, durante la previtelogénesis y la preespermatoogénesis, existen células FSH inmunorreactivas, no detectándose células LH. Durante la vitelogénesis y en la espermatogénesis aparecen algunas células LH inmunorreactivas, siendo las células FSH mucho más numerosas. En cambio, durante la ovulación y la espermiación, el número de células LH es mayor que el de FSH. Los radioinmunoensayos realizados en hipófisis y plasma de diversos teleósteos han corroborado que los niveles de FSH son más elevados durante la previtelogénesis y la vitelogénesis en hembras y durante la espermatogénesis en machos, y decaen en la época de la puesta y espermiación. En cambio, los niveles de LH son constantemente bajos durante la vitelogénesis y la espermatogénesis y se incrementan en la época de la maduración-puesta y espermiación (Suzuki et al., 1988d; Swanson, 1991).

En algunas especies, como la trucha o el carpín dorado, se han analizado de forma conjunta las variaciones estacionales de los ARNm de las distintas subunidades de las gonadotropinas (α , β FSH, β LH), (Gomez et al., 1999; Sohn et al., 1999), los contenidos de FSH y LH hipofisarios y los niveles plasmáticos de FSH y LH (Gómez et al., 1999). En la trucha, los niveles de ARNm β FSH se incrementan con anterioridad al aumento en los niveles de los ARNm β LH. Algo similar sucede con los niveles de FSH en la hipófisis, que se elevan al inicio de la vitelogénesis, mientras que los niveles de LH hipofisarios resultan indetectables durante la fase de vitelogénesis y se elevan durante la fase de maduración y puesta. A su vez, los niveles de FSH son detectables en el plasma en todos los momentos del ciclo, en contraste con los niveles plasmáticos de LH, que muestran un pico durante la fase de maduración final y puesta (Gomez et al., 1999). Sin embargo, este patrón diferencial de expresión de FSH y LH a lo largo del ciclo, característico de salmónidos, no se observa en el carpín dorado (Sohn et al., 1999) ni en otras especies, como la lubina (Mateos et al., 2003), en las cuales las funciones de la FSH y la LH a lo largo del ciclo reproductivo no están del todo esclarecidas.

2.2.3.- Los receptores de gonadotropinas en los Teleósteos y sus mecanismos de acción

Las gonadotropinas, como las demás hormonas protéicas, se unen a receptores presentes en la membrana plasmática de las células diana (Dias, 1992). En mamíferos, el receptor de LH fue purificado en la década de los 70 y clonado en 1989 (McFarland et al., 1989). En la rata, los receptores de LH y FSH son proteínas monoméricas de 93 kDa y 75 kDa, respectivamente, mientras que el receptor de TSH parece ser un polímero proteico (McFarland et al., 1989; Dias, 1992). La estructura y la secuencia de los receptores de hormonas glicoproteicas presentan notables similitudes, en concordancia con las homologías que presentan las propias hormonas glicoproteicas (Mineghisi et al., 1990). Todos ellos pertenecen a una familia de receptores acoplados a la proteína G con el dominio N-terminal probablemente implicado en la unión a la hormona y con siete segmentos transmembrana característicos en el dominio C-terminal (Salesse, 1991).

Los estudios de unión de las hormonas glicoprotéicas a sus receptores parecen indicar que, antes de unirse a la hormona, el receptor de LH está distribuido por la membrana plasmática en forma aislada o formando pequeños agregados. Cuando se produce la unión de la hormona, tiene lugar una rápida

asociación de receptores formando agregados que contendrían no más de 20 receptores, asociación que parece necesaria para la acción hormonal, para la internalización del complejo hormona-receptor, la desensibilización o el reciclaje de los receptores (Roess et al., 1992). La desensibilización de los receptores puede ser provocada por una exposición prolongada a la hormona o sus agonistas. El desacoplamiento del receptor de su sistema de transducción y la fosforilación del receptor por acción de proteínas kinasas tales como la proteína kinasa C o la kinasa A, parecen desempeñar un papel crucial en este proceso (Lohse, 1993).

En Mamíferos, está aceptado que la LH y la FSH interaccionan con sus receptores de membrana para estimular la esteroidogénesis utilizando el 3'-5'-Adenosín-monofosfato-cíclico (AMPC) como segundo mensajero (Hunzicker-Dunn y Birnbaumer, 1976). No obstante, también se han sugerido mecanismos de acción que implican a los lípidos de membrana (la vía de los inositol fosfatos), así como a los canales de Cl^- y Ca^{2+} (Guderman et al., 1992). Asimismo, la LH provoca la liberación de ácido araquidónico en las células de Leydig, probablemente via fosfolipasa A_2 (PLA_2) y los metabolitos de este ácido parecen implicados en la esteroidogénesis inducida por LH (Cooke et al., 1991).

La presencia de receptores de gonadotrofinas se ha evidenciado en distintas especies de teleósteos (Van der Kraak, 1983; Schulz et al., 1985; Kanamori y Nagahama, 1988; Le Gac et al., 1988; Oba et al., 2001; Schulz et al., 2001; Kumar and Trant, 2001). En la trucha arcoiris, *Onkorynchus mykiss*, el receptor de LH ha sido purificado a partir de membranas plasmáticas de ovario y se ha demostrado que posee un solo sitio de unión de alta afinidad para gonadotrofinas (Quesnel y Breton, 1993). En el testículo de trucha arcoiris en regresión, el número de receptores para LH es muy bajo y se va incrementando durante la gametogénesis hasta llegar a su máximo en el momento de la espermiación (LeGac y Fostier, 1987). En el ovario de la trucha marrón el número de sitios de unión para gonadotrofinas aumenta al iniciarse la vitelogénesis, se mantiene constante conforme esta progresa y se eleva bruscamente en el momento de la ovulación (Breton y Sambroni, 1989). Resultados similares se obtuvieron en otros salmónidos (Kanamori y Nagahama, 1988).

Los mecanismos intracelulares de transducción que siguen a la unión de las gonadotrofinas a sus receptores en las gónadas de peces teleósteos, parecen ser comunes a los descritos para Mamíferos. Así, se ha evidenciado la mediación del AMPC (vía de la adenilato ciclasa) en la esteroidogénesis de diversas especies de teleósteos, tales como *Carassius auratus* o *Cyprinus carpio* (Salmon et al., 1985). Se ha sugerido también, la implicación de otras posibles vías de transducción, ya que existen estudios que muestran los efectos del Ca^{2+} y de la proteína kinasa C en la respuesta a las gonadotrofinas de los folículos preovulatorios de diversas especies (Van der Kraak, 1992; Petrino et al., 1991).

2.2.4.- Acción fisiológica de las gonadotrofinas

Al hablar de los papeles fisiológicos de las gonadotrofinas en teleósteos surge nuevamente el tema de la dualidad; las dos gonadotrofinas purificadas por el grupo de Kawauchi descritas anteriormente, fueron capaces

de estimular la síntesis y secreción de estradiol *in vivo* e *in vitro* en numerosos experimentos. Este tipo de ensayos, así como los que valoraban la ruptura de la vesícula germinal en los ovocitos, no resultaron discriminatorios para diferenciar las actividades biológicas de ambas gonadotrofinas (Swanson et al., 1991). En la carpa, tanto la capacidad esteroidogénica como la capacidad de inducción de la maduración, la ovulación y la captación de vitelogenina por el ovario, resultaron equipotentes para las dos gonadotrofinas (Van der Kraak, 1992). Esta falta de especificidad en la capacidad esteroidogénica de las gonadotrofinas se produjo también en los primeros ensayos realizados con las LH y FSH de mamíferos. Sin embargo, en salmón la LH es más potente al estimular la síntesis de esteroides maduracionales: de 17α -hidroxiprogesterona en las células de la teca del ovario y de $17\alpha,20\beta$ -dihidroxi-4-pregnen-3-ona en las células de la capa granulosa (Suzuki et al., 1998b, d; Swanson et al., 1989). En el atún, *Thunnus obesus*, la LH fue más potente al estimular la síntesis de 17β -estradiol y de testosterona *in vitro* que la FSH (Okada et al., 1994).

Las gonadotrofinas también estimulan la esteroidogénesis testicular, variando esta respuesta a lo largo de la espermatogénesis (Schulz y Blum, 1990). Tanto la FSH como la LH son capaces de estimular la producción *in vitro* de 11 cetotestosterona (11-KT) y de $17\alpha,20\beta$ dihidroxiprogesterona ($17\alpha,20\beta$ DHP) por parte del testículo (Planas et al., 1993). Ambas gonadotrofinas son equipotentes en la estimulación de la producción de estos esteroides durante las fases tempranas de la espermatogénesis, si bien la producción de 11-KT es mayor y aumenta conforme progresa la espermatogénesis. En cambio, durante las últimas etapas de espermatogénesis la LH es más activa que la FSH en la estimulación de la producción de $17\alpha,20\beta$ DHP.

Como vimos anteriormente, al menos en salmónidos la FSH es más abundante durante las fases de vitelogénesis/espermatogénesis, en las que los niveles de LH resultan bajos (Swanson, 1991). Estos resultados inducen a pensar que la FSH desempeña un importante papel fisiológico en estas primeras etapas del desarrollo gonadal. El descenso en los niveles de FSH y el aumento en los niveles de LH durante la fase de maduración-puesta y previo a la espermiación sugiere, a su vez, que esta última juega un papel preponderante en las etapas finales de la gametogénesis y esteroidogénesis gonadal. Además, los niveles elevados de FSH se correlacionan con niveles elevados de 17β -estradiol (E_2) en hembras y de 11-KT en machos, mientras que el aumento en los niveles de LH se asocia a un incremento en la producción de progestinas maduracionales como la $17\alpha,20\beta$ DHP (Swanson, 1991). Resulta tentativo pensar que estos cambios en los niveles de FSH y LH durante el ciclo reproductivo están asociados al cambio de la ruta esteroidogénica que tiene lugar en la transición de la vitelogénesis/espermatogénesis a la maduración-puesta/espermiación.

3.- CEREBRO Y REPRODUCCIÓN EN PECES

El control nervioso de la reproducción reside en dos sistemas: por un lado, los *sistemas sensoriales* implicados en la percepción de los estímulos

externos, y por otro lado, los *sistemas hipofisiotrópicos*, implicados directamente en el control del estatus endocrino óptimo para que se produzca la reproducción. Estos niveles de control e integración están asentados en unos soportes anatómicos concretos y son ejercidos por sustancias en la mayoría de los casos conocidas (Kah et al., 1993; Trudeau et al., 1997). Ambos aspectos los describimos a continuación.

El concepto de control neuroendocrino sobre la hipófisis fue introducido por Scharrer en 1928, trabajando en un pez teleosteo. Estudios posteriores consideraron como único factor cerebral responsable de la liberación de gonadotrofinas a la GnRH, denominada inicialmente hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH), y que fue aislada por primera vez del hipotálamo del cerdo y del cordero (Matsuo et al., 1971; Schally et al., 1971). La consideración inicial de este único sistema hipofisiotrópico limitó el estudio del control de la actividad hipofisaria a la identificación de estos sistemas GnRH. El rápido desarrollo de la inmunocitoquímica permitió mostrar que, en todas las especies estudiadas, los sistemas GnRH residían en núcleos cerebrales de localización difusa (Barry et al., 1985). En la actualidad, está bien establecido que la secreción de gonadotrofinas en la hipófisis de teleosteos no está regulada exclusivamente por la GnRH, sino que está sometida al control, tanto estimulador como inhibidor, de diversos factores cerebrales (Kah et al., 1993; Trudeau et al., 1997).

3.1.- Principales áreas neuroendocrinas implicadas en el control de la reproducción

A diferencia de vertebrados tetrápodos, los peces teleosteos carecen de un sistema portal hipotálamo-hipofisario. De esta forma, las neurohormonas que controlan la actividad de los diferentes tipos de células adenohipofisarias se liberan directamente desde los terminales nerviosos en el entorno de las células diana (Batten e Ingleton, 1987). Esta inervación directa se considera el equivalente funcional de la eminencia media de tetrápodos. En algunos grupos de peces (salmónidos y anguilas), la neurohipófisis se encuentra totalmente separada de la adenohipófisis por una membrana basal, de forma que los terminales nerviosos que contienen los productos de neurosecreción se disponen en aposición a la misma y las neurohormonas liberadas deben atravesar esta membrana basal para alcanzar a las células diana. En cambio en otras especies de peces (p.e. ciprínidos) la membrana basal es discontinua y las fibras neurosecretoras penetran en la adenohipófisis inervando de forma directa a las células secretoras adenohipofisarias (Batten e Ingleton, 1987). Así, la distribución en la hipófisis de las fibras implicadas en la secreción de un tipo celular concreto suele corresponderse de forma bastante precisa con la distribución de ese tipo de célula adenohipofisaria. Esta inervación directa de la adenohipófisis en peces teleosteos y la correspondencia en la distribución de las fibras neurosecretoras y los tipos de células que éstas regulan, resultan de enorme utilidad para discernir qué tipo de factores cerebrales controlan qué funciones adenohipofisarias. Prueba de ello es que la presencia de fibras secretoras de neuropéptido Y o GABA en el entorno de las células gonadotropas del carpín dorado representaron el punto de partida para los estudios posteriores que pusieron de manifiesto los efectos de ambos factores en la secreción de gonadotrofinas en ésta y otras especies (Kah et al., 1989, 1992).

Estudios llevados a cabo en peces teleósteos han puesto de manifiesto que la regulación central de la actividad hipofisaria, de los procesos reproductivos y de sus comportamientos asociados, no está restringida al hipotálamo, como se creía en un principio, sino que se extiende a otras áreas nerviosas (Kah et al., 1993). El empleo de técnicas de tinción retrógrada, como la implantación de cristales de Dil (una carbocianina lipofílica fluorescente) en tejidos prefijados en paraformaldehído, ha permitido establecer el origen de las inervaciones que recibe la hipófisis, independientemente de su carácter (GnRH, dopaminérgico, etc) (Anglade et al., 1993). De acuerdo con los estudios de estos autores en el carpín dorado, *Carassius auratus*, y con los de Johnston y Maler (1992) en el pez eléctrico, *Apteronotus leptorhynchus*, se han descrito neuronas que envían sus axones hacia la hipófisis en el bulbo olfativo, el tracto olfatorio medial, el telencéfalo ventral, el núcleo entopeduncular caudal, la región preóptica (núcleo preóptico periventricular, núcleo preóptico parvicelular, núcleo preóptico magnocelular, núcleo anterior periventricular, núcleo supraquiasmático), el hipotálamo mediobasal (núcleo lateral tuberal, núcleo anterior tuberal, núcleo posterior periventricular, núcleo del receso lateral, núcleo del receso posterior) y el tálamo (núcleo dorsolateral talámico). Estos autores también citan la presencia de células que inervan la hipófisis en el tegmento rostral mesencefálico y más caudalmente, probablemente en el locus cerúleo.

3.2.- Factores cerebrales implicados en el control neuroendocrino de la reproducción

Como se ha comentado anteriormente, el número de los factores implicados en el control de la actividad hipofisaria aumenta conforme avanzan los estudios. Así, entre los factores que modulan directa o indirectamente la liberación de las gonadotrofinas, hay neuropéptidos como la GnRH, el neuropéptido Y, los péptidos opioides, la galanina o la colecistoquinina, aminas como la dopamina, la noradrenalina y la serotonina y, por último, aminoácidos neurotransmisores como el GABA (ácido γ amino butírico), la taurina, el ácido glutámico, el ácido aspártico o la β -alanina (Peter et al., 1991; Kah et al., 1993; Trudeau et al., 1997).

3.2.1. La hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH)

Desde el descubrimiento de la GnRH de mamíferos (mGnRH, Schally et al., 1971; Matsuo et al., 1971), se han identificado 14 isoformas diferentes de GnRH en vertebrados (Matsuo et al., 1971; King y Millar, 1982a; King y Millar, 1982b; Sherwood et al., 1983; Ngamvongchon et al., 1992; Lovejoy et al., 1992; Sower et al., 1993; Powell et al., 1994; Powell et al., 1996a; Jimenez-Liñan et al., 1997; Carolsfeld et al., 2000; Okubo et al., 2000; Yoo et al., 2000; Montaner et al., 2001), si bien la presencia de moléculas de tipo GnRH se ha puesto también de manifiesto en protocordados e invertebrados (Powell et al., 1996b, Zhang et al., 2000; Iwakoshi et al., 2002 y Adams et al., 2003). Estas formas de GnRH han recibido tradicionalmente el nombre de la especie en la que han sido puestas de manifiesto por primera vez, si bien pueden estar presentes en otras especies distintas.

Dentro de vertebrados, los peces teleósteos representan el grupo filogenético que expresa un mayor número de variantes de GnRH. Así, tras la identificación de la forma GnRH de salmon (Sherwood et al., 1983), se han

purificado y secuenciado otras siete isoformas de GnRH. De estas ocho isoformas de GnRH, seis son específicas de teleósteos: GnRH de salmón (sGnRH; Sherwood et al., 1983), GnRH de pez gato (cfGnRH; Bogerd et al., 1992; Ngamvongchon et al., 1992), GnRH de dorada (sbGnRH; Powell et al., 1994), GnRH de arenque (hrGnRH; Carolsfeld et al., 2000), GnRH de medaka o pejerrey (mdGnRH, Okubo et al., 2000: pjGnRH, Montaner et al., 2001) y GnRH de corégono (wfGnRH; Adams et al., 2002). Además, los teleósteos expresan la forma GnRH de mamífero (mGnRH; Matsuo et al., 1971) y la forma más extendida de GnRH en la escala filogenética, la GnRH II de pollo (cGnRH-II; Miyamoto et al., 1984), que fueron identificadas por primera vez en peces en la anguila (King et al., 1990) y el carpín dorado (Yu et al., 1988), respectivamente.

Recientemente, se ha propuesto una nueva clasificación de las distintas formas de GnRH, basada en el análisis filogenético de las diferentes secuencias obtenidas y en los sitios de expresión de estas formas de GnRH (Fernald and White, 1999). Así, la forma GnRH I englobaría todas las formas hipofisiotróficas de GnRH, que se expresan principalmente en el hipotálamo y el área preóptica de vertebrados. La forma GnRH 2 se corresponde con la GnRH II de pollo, que se expresa de forma conservada en el sinencéfalo de todos los vertebrados, desde peces hasta mamíferos. La tercera forma de GnRH, GnRH 3, se corresponde con la forma GnRH de salmon, que hasta la fecha sólo se ha identificado de forma concluyente en el cerebro anterior de peces. No se sabe, por tanto, si esta forma de GnRH se ha perdido en vertebrados terrestres, o está presente en los mismos y aún no se ha puesto de manifiesto.

En peces teleósteos, el patrón básico de distribución de las células GnRH sugirió la existencia de dos sistemas principales: un sistema GnRH distribuido a lo largo de la porción ventral del cerebro anterior (nervio terminal, telencéfalo ventral, área preóptica e hipotálamo) y que expresa distintas formas de GnRH según las especies, y otro sistema GnRH en la transición entre el diencéfalo y el mesencéfalo (sinencéfalo), que expresa de forma conservada cGnRH-II (Goos et al., 1985; Kah et al., 1986; Batten et al., 1990; Kah et al., 1991; Rodríguez-Gómez et al., 1999).

Estudios llevados a cabo posteriormente en peces del orden perciformes, pusieron de manifiesto que estos teleósteos evolucionados expresaban tres formas distintas de GnRH en el cerebro: sGnRH, sbGnRH y cGnRH-II (Powell et al., 1994; White et al., 1995; Senthilkumaran et al., 1999). Estas tres formas de GnRH tenían una clara acción estimuladora sobre la liberación de gonadotropinas hipofisarias, siendo más potentes los efectos de las formas cGnRH-II y sGnRH respecto a la forma sbGnRH (Zohar et al., 1995). Sin embargo, la forma sbGnRH presentaba unos niveles mucho más elevados en la hipófisis de perciformes, lo que puso de manifiesto que era esta isoforma la que desempeñaba de forma fisiológica las funciones hipofisiotróficas (Powell et al., 1994; Holland et al., 1998; Rodríguez et al., 2000; González-Martínez et al., 2002a). Las formas sGnRH y cGnRH-II parecen desempeñar acciones neurotransmisoras, neuromoduladoras y/o conductuales, si bien sus funciones no están aún del todo esclarecidas (Zohar et al., 1995; Fernald y White, 1999).

Además, los sistemas celulares que expresaban estas tres formas de GnRH parecían presentar una clara segregación neuroanatómica en el cerebro de perciformes (Gothilf et al. 1996; White y Fernald, 1998). Así, la expresión de

la forma sGnRH tenía lugar en células de los bulbos olfativos y del nervio terminal; las células del área preóptica expresaban la forma sbGnRH; y por último, la forma cGnRH-II se expresaba en células del sinencéfalo dorsal, en la transición entre el diencefalo y el mesencefalo (Gothilf et al., 1996; Parhar, 1997). Basándose en esta segregación neuroanatómica y funcional, así como en observaciones obtenidas durante el desarrollo ontogénico, diversos autores propusieron que los tres sistemas GnRH que se expresaban en el cerebro de perciformes se originaban a partir de distintos primordios embrionarios (Parhar, 1997). Así, las neuronas que expresaban sGnRH se desarrollarían a partir de la placoda olfativa, mientras que las células sbGnRH y cGnRH-II lo harían desde primordios del área preóptica basal y del mesencefalo, respectivamente. Sin embargo, en vertebrados como los anfibios, aves y mamíferos, todas las células GnRH del cerebro anterior se desarrollan a partir de un mismo primordio en la placoda olfativa, mientras que las células GnRH del cerebro medio se originan a partir de otro primordio en la zona germinal del tercer ventrículo (Schwanzel-Fukuda y Pfaff, 1989; Schwanzel-Fukuda, 1999).

Estudios recientes llevados a cabo en la lubina (*Dicentrarchus labrax*), en nuestro laboratorio, han puesto de manifiesto que las áreas de expresión de las formas de GnRH del cerebro anterior de perciformes (sGnRH y sbGnRH) no están segregadas sino que se solapan desde el bulbo olfativo hasta el área preóptica (González-Martínez et al., 2001; González-Martínez et al., 2002a). Resultados similares han sido descritos recientemente en *Cichlasoma dimerus* (Pandolfi et al., en prensa), lo que sugiere que ambas formas de GnRH comparten un origen embrionario y se han originado a partir de un gen ancestral común. En esta dirección, los estudios ontogénicos llevados a cabo en la lubina han mostrado un origen de ambas formas de GnRH (sGnRH y sbGnRH) en primordios olfativos, y un solapamiento en la expresión de las mismas desde el bulbo olfativo hasta el área preóptica a lo largo del desarrollo (González-Martínez et al., 2002b; 2004a), lo que refuerza la consideración de un origen común para las formas de GnRH que se expresan en el cerebro anterior. Estos resultados se han visto reforzados por los estudios llevados a cabo recientemente por Okubo y colaboradores (2004) en medaka. No obstante, y como en otros perciformes, la forma sbGnRH es la más abundante en la hipófisis de la lubina (González-Martínez et al., 2002a) y parece representar la forma funcional en la regulación de la síntesis y secreción de gonadotrofinas.

Hoy en día, existen evidencias de que la expresión de 3 formas distintas de GnRH en el cerebro de teleósteos no está restringida a perciformes y es, probablemente, una característica de todos los teleósteos, ya que también se han detectado 3 isoformas de GnRH distintas en clupeiformes (*Clupea harangus*, Carosfeld et al., 2000), caraciformes (*Piaractus mesopotamicus*, Powell et al., 1997), salmoniformes (*Coregonus clupeaformis*, Adams et al., 2002), ateriniformes (*Odonthestes bonariensis*, Montaner et al., 2001), sinbranchiformes (*Synbranchus marmoratus*, Somoza et al., 2002), beloniformes (*Oryzias latipes*, Okubo et al., 2000), ciprinodontiformes (*Xiphophorus maculatus*, *Xiphophorus helleri*, Somoza et al., 2002), escorpeniformes (*Sebastes rastrelliger*, Powell et al., 1996a), pleuronectiformes (*Scophthalmus maximus*, Anderson et al., 2001; *Verasper moseri*, Amano et al., 2002) y tetraodontiformes (*Fugu rubripes*, Aparicio et al., 2002, Lethimonier et al., 2004). Además, la presencia de una tercera forma de GnRH ha sido

sugerida en otros vertebrados, incluidos los humanos (Sherwood et al., 1986; Montaner et al., 1998; Yahalom et al., 1999).

Como hemos comentado previamente, la función principal de la GnRH es la estimulación de la secreción de gonadotrofinas hipofisarias, en particular, de la forma de GnRH que se expresa en la región preóptica (sbGnRH en perciformes, Zohar et al., 1995; Holland et al., 1998; Rodríguez et al., 2000). Además, los estudios llevados a cabo en el carpín dorado demuestran que la GnRH (sGnRH y cGnRH-II) también estimula la síntesis de las subunidades α y β de la LH, y estos efectos están relacionados con el estado de madurez sexual de los individuos (Khakoo et al., 1994). Asimismo, en ciprínidos se han descrito efectos estimuladores de la GnRH sobre la secreción de hormona de crecimiento, si bien estas acciones parecen depender de la especie ya que en salmónidos son menos evidentes, y en peces gato no se han podido determinar (Trudeau et al., 1997; Weil et al., 1999). Los decapeptidos de la familia GnRH también parecen involucrados en el control de las conductas reproductivas en hembras de carpín dorado (Volkoff and Peter, 1999).

La hormona liberadora de gonadotrofinas desencadena sus acciones hipofisiotróficas tras unirse a receptores específicos presentes en la membrana de las células gonadotropas adenohipofisarias (Conn and Crowley, 1994). Estos receptores de GnRH pertenecen a una superfamilia de receptores acoplados a la proteína G y poseen una sola cadena polipeptídica con siete dominios transmembrana hidrofóbicos separados por giros hidrófilos extra e intra-celulares de extensión variable (Sealfon et al., 1997). En mamíferos, la estructura del receptor de GnRH es característica debido a la ausencia del dominio intracelular presente en los receptores de los demás vertebrados (Sealfon et al., 1997). La interacción de la GnRH con su receptor desencadena una cascada de reacciones intracelulares que se inicia con la activación de la proteína G, y conduce a la producción de segundos mensajeros del tipo del inositol trifosfato, diacilglicerol o iones calcio (Klausen et al., 2002), que estimulan la síntesis y secreción de las gonadotrofinas (FSH y LH).

Aunque los primeros receptores de GnRH en peces se pusieron de manifiesto en la hipófisis, hoy resulta evidente que también se expresan en tejidos extrahipofisarios como el cerebro, las gónadas, el hígado o el riñón, reforzando la idea de que estos decapeptidos no sólo ejercen acciones reproductivas a nivel de la hipófisis, sino que pueden actuar como neurotransmisores y/o neuromoduladores en el cerebro, y como factores paracrinos en las gónadas (Marshall et al., 1976; Habibi y Patti, 1993; Yu et al., 1998). La presencia de receptores de GnRH en tejidos somáticos que no están involucrados directamente en la reproducción sugiere un papel importante de estos receptores de GnRH en la mediación de las acciones autocrinas/paracrinas de la GnRH sobre otros procesos fisiológicos, que aún deben ser esclarecidas.

Diferentes estudios han puesto de manifiesto la existencia de variaciones en el número de receptores de GnRH hipofisarios a lo largo del ciclo reproductivo (Habibi y Peter, 1991; González-Martínez et al., 2004b). Asimismo, la capacidad y/o expresión de los receptores de GnRH puede verse alterada por el entorno endocrino, y en concreto por la gonadectomía (Marian et al., 1981), el tratamiento con GnRH (Kaiser et al., 1993), dopamina (De Leeuw et al., 1989) y esteroides gonadales (Trudeau et al., 1993; Seong et al., 1998).

El notable desarrollo de las técnicas moleculares permitió, al inicio de los años noventa, la clonación, secuenciación y expresión del primer receptor de GnRH en humanos (Kakar et al., 1992; Sealfon et al., 1997). En los últimos años, también se han clonado y caracterizado los cDNAs de distintos receptores de GnRH presentes en peces de los ordenes anguiliformes, cipriniformes, salmoniformes, beloniformes, perciformes y tetraodontiformes (ver Lethimonier et al., 2004). Estos estudios han puesto de manifiesto que al igual que se expresan dos o tres formas distintas de GnRH en vertebrados, también se pueden expresar dos o más tipos distintos de receptores de GnRH (Troskie et al., 1998). Estas evidencias sugieren que ha existido una evolución conjunta de las GnRHs y de sus receptores y que, posiblemente, existe una especialización funcional y topográfica en el establecimiento de sus interacciones. De hecho, uno de estos tipos de receptores de GnRH se expresa de forma mayoritaria en las células gonadotropas de la adenohipófisis y, en menor medida, en el cerebro, y muestra diferencias significativas en su expresión durante el ciclo reproductivo (González-Martínez et al., 2004b), lo que sugiere un papel relevante de este receptor en el control de la secreción de gonadotrofinas y del ciclo reproductivo. Sin embargo, existe otro tipo de receptor de GnRH que presenta una elevada expresión en cerebro y una baja expresión en la hipófisis (Madigou et al., 2000), y que podría estar mediando las acciones neurotransmisoras y/o neuromoduladoras de la GnRH (Lethimonier et al., 2004).

3.2.2. La dopamina

Como se ha indicado anteriormente, los niveles de LH en algunos teleosteos resultan muy bajos durante la mayor parte del ciclo reproductivo y se elevan considerablemente durante la fase de maduración/puesta (Suzuki et al., 1988d; Swanson, 1991), lo que sugiere la existencia de una inhibición que se ejerce durante las fases tempranas de la gametogénesis. Esta inhibición fue puesta de manifiesto por primera vez por Peter y Paulencu (1980), mediante una serie de lesiones electrolíticas cerebrales llevadas a cabo en hembras de carpín dorado. En concreto, las lesiones en el área preóptica y el hipotálamo desencadenaban una elevación en los niveles de gonadotrofinas y la ovulación en animales mantenidos a 12°C, una temperatura a la cual estos animales no ovulan en condiciones normales, sugiriendo que las lesiones destruían estructuras cerebrales que secretaban un factor de naturaleza inhibidora.

Poco despues, Chang et al. (1983), usando ensayos de perfusión con celulas dispersas y fragmentos de hipófisis de carpines dorados, demostraron que este factor inhibidor de la secreción de gonadotrofinas se correspondía con la dopamina. Asimismo, estos autores caracterizaron los tipos de receptores de dopamina implicados en estas acciones determinando los efectos de diversos agonistas y antagonistas específicos sobre la secreción de gonadotrofinas basal e inducida por GnRH (Chang et al., 1990). Estos estudios mostraron que los agonistas y/o antagonistas de los receptores de dopamina de tipo D1 no tenían efectos en la secreción basal de gonadotrofinas ni en la estimulación de la secreción de gonadotrofinas inducida por GnRH. En cambio, los agonistas de los receptores de tipo D2 inhibían la liberación de gonadotrofinas inducida por GnRH, y este efecto era revertido por antagonistas específicos de los receptores D2. Estas evidencias demostraron que estas acciones de la dopamina se ejercían sobre receptores de tipo D2 (Chang et al., 1990). Además, la dopamina también inhibe la síntesis y la liberación de GnRH

en el telencéfalo, la región preóptica y la hipófisis (Peter et al., 1991, Trudeau, 1997).

Además del carpín dorado, la inhibición dopaminérgica de la secreción de gonadotrofinas a través de receptores de tipo D2 ha sido demostrada en otras especies de peces teleósteos, tales como la anguila, el pez gato, la trucha, el salmon coho o la carpa (Pasqualini et al., 2004). Sin embargo, esta inhibición no parece clara en otros peces teleósteos, en particular en perciformes marinos (Pasqualini et al., 2004). Las acciones inhibitorias de la dopamina se ejercen, sobre todo, sobre las células secretoras de LH (Yaron et al., 2003). No obstante, en la trucha también se han descrito efectos de la dopamina sobre los niveles de FSH (Vacher et al., 2000). Estas acciones de la dopamina están moduladas por los esteroides sexuales y, en particular, por el estradiol. Así, en la trucha se ha descrito que el estradiol estimula la síntesis de la tirosina hidroxilasa, la enzima clave para la síntesis de dopamina (Vetillard et al., 2003) y que la expresión del receptor de dopamina D2 es elevada cuando los niveles de estradiol son elevados y disminuye cuando los niveles de estradiol decaen (Vacher et al. Datos no publicados).

La inervación dopaminérgica que inhibe la liberación de gonadotrofinas en la hipófisis descrita por Peter y Paulencu (1980), se origina mayoritariamente en las células catecolaminérgicas presentes en el área preóptica antero-ventral, que establecen contacto directo con las células gonadotropas (Kah et al., 1986, Kah et al., 1987, Anglade, 1994). Además, estas neuronas dopaminérgicas del área preóptica reciben una intensa inervación GnRH, que puede ser responsable del cese de la inhibición en la secreción de gonadotrofinas por DA, en el momento de la ovulación. A su vez, las neuronas GnRH del telencéfalo ventral y del área preóptica reciben contactos sinápticos axo-somáticos y axodendríticos de fibras dopaminérgicas (Anglade et al., 1991).

3.2.3. El neuropéptido Y

El neuropéptido tirosina o NPY es un péptido de 36 aminoácidos de la familia del polipéptido pancreático, que fue aislado por primera vez a partir del cerebro de cerdos (Tatemoto, 1982), y que está implicado en el control de la ingesta y el metabolismo tanto en peces como en mamíferos.

La distribución de las neuronas secretoras de NPY ha sido analizada en peces mediante técnicas de inmunohistoquímica e hibridación *in situ* y ha permitido localizarlas en el bulbo olfativo, la porción central del telencéfalo dorsal, el área preóptica caudal, el tálamo, el techo óptico, el *nucleo entopeduncularis* y el *locus coeruleus*, siendo estos dos últimos núcleos los que parecen enviar las fibras NPY que alcanzan la hipófisis, para establecer contacto con las células gonadotropas (Pontet et al., 1989; Breton et al., 1991; Kah et al., 1993, Cerdá-Reverter et al., 2000, Rodríguez-Gómez et al., 2001).

Así, el NPY estimula la secreción de LH actuando directamente sobre las células gonadotropas hipofisarias en el carpín dorado y la trucha arcoiris (Kah et al., 1989; Peng et al., 1993; Danger et al., 1991; Trudeau, 1997) pero también estimulando la liberación de GnRH en el área preóptica/hipotálamo y en la hipófisis (Peter et al., 1991; Breton et al., 1991, Trudeau, 1997). La respuesta de la hipófisis al NPY puede ser bloqueada por la dopamina y presenta una marcada estacionalidad, que parece depender de los niveles de esteroides (Peter et al., 1991; Breton et al., 1991; Peng et al., 1993). Además, mediante hibridación *in situ* se ha puesto de manifiesto que el estradiol y la

testosterona estimulan la expresión génica del NPY, sobre todo a nivel del área preóptica (Peng et al., 1994).

El NPY también estimula en peces la secreción de hormona de crecimiento (Peng et al., 1993, Trudeau, 1997). Esta diversidad de efectos confiere al NPY un papel relevante en la mediación de las interacciones entre reproducción, metabolismo y crecimiento. De hecho, numerosas especies de peces presentan una tasa de ingesta elevada durante la fase no reproductiva y cesan su ingesta en el momento de la reproducción. En este sentido, se ha descrito que la expresión del NPY aumenta en el área preóptica del salmón durante el ayuno (Silverstein et al., 1998). Asimismo, el efecto del NPY sobre la liberación de LH en la lubina depende del estado energético de los animales, siendo mucho mayor en el estado de ayuno, característico de la fase reproductiva (Cerdá-Reverter et al., 1999).

3.2.4. El GABA y otros aminoácidos neurotransmisores

En cuanto a los aminoácidos neurotransmisores, el ácido γ -amino butírico (GABA) representa el principal neurotransmisor inhibitor en el cerebro de vertebrados. En el carpín dorado, el GABA está presente, a elevadas concentraciones, en el sistema hipotálamo-hipofisario, existiendo fibras GABAérgicas procedentes de la región preóptica y/o del *núcleo lateralis tuberis* hipotalámico, en contacto directo con las células gonadotropas (Martinoli et al., 1990; Kah et al., 1992). La inyección con GABA provoca un aumento en la liberación de LH en el carpín dorado, acción que podría ejercerse directamente sobre las células gonadotropas, ya que en éstas se observa también un aumento en los niveles intracelulares de iones calcio (Kah et al., 1992, Trudeau, 1997). El GABA también estimula la liberación de GnRH en los terminales nerviosos de la hipófisis (Kah et al., 1992, Trudeau, 1997) e inhibe la actividad de las células dopaminérgicas (Trudeau, 1997). Además, los inhibidores de la GABA-transaminasa producen una acumulación de GABA en el cerebro y la hipófisis, y un aumento en los niveles plasmáticos de gonadotrofinas. Estos efectos estimuladores del GABA son estacionales y están modulados por el estradiol (Kah et al., 1992). A su vez, el tratamiento con estradiol provoca un descenso en la concentración de GABA en el telencéfalo del carpín dorado (Kah et al., 1992). Los efectos del estradiol sobre las células GABAérgicas parecen ser directos ya que, al menos en la trucha, las células GABA del área preóptica expresan receptores de estrógenos (I. Anglade and O. Kah, comunicación personal). En la trucha, el GABA ejerce acciones estimuladoras tanto en la secreción de LH como de FSH, y como sucede en el carpín dorado, estos efectos dependen del estado reproductivo de los animales, pero también del sexo (Mañanos et al., 1999). Estas acciones del GABA pueden ejercerse de forma directa sobre las células gonadotropas ya que el GABA estimula tanto la secreción basal de FSH y LH como la secreción inducida por GnRH en cultivos de células hipofisarias dispersas (Mañanos et al., 1999).

La taurina es otro aminoácido neurotransmisor que está presente a elevadas concentraciones en el cerebro y la hipófisis del carpín dorado; provoca un rápido aumento en los niveles de gonadotrofinas del suero y parece actuar modulando los efectos inhibidores de la dopamina en la liberación de gonadotrofinas (Peter et al., 1991, Trudeau, 1997). El ácido glutámico está presente en fibras y células de la hipófisis, incluidas las células gonadotropas (Kah et al., 1993). El glutamato monosódico produce un aumento en los niveles séricos de LH y potencia la liberación de LH en respuesta a GnRH,

probablemente actuando a través de receptores de NMDA (Kah et al., 1983, Trudeau, 1997). Otro aminoácido neurotransmisor, la β -alanina, tiene también efectos estimuladores sobre la secreción *in vivo* de LH (Sloley et al., 1992b), si bien su presencia en el cerebro o la hipófisis de peces no se ha puesto aún de manifiesto.

3.2.5. Péptidos opioides y otros neuropéptidos

Los péptidos opioides endógenos también han sido implicados en la regulación del eje cerebro-hipófisis-gónada en numerosas especies de mamíferos (Cicero et al., 1985; Gilbeau et al., 1987, Trudeau, 1997). Los agonistas de péptidos opioides inhiben la liberación de dopamina, mientras que sus antagonistas la estimulan (Leadem et al., 1985). Se ha demostrado la existencia de diversos péptidos opioides en el cerebro de teleósteos y la presencia de receptores específicos para estos (Kawauchi et al., 1980; Pert et al., 1974; Rosemblun y Callard, 1988). Asimismo, se ha demostrado la modulación por péptidos opioides de la secreción de dopamina y de la respuesta de la hipófisis a GnRH y a dopamina en el carpín dorado (Rosemblun y Peter, 1989).

En el carpín dorado, la colecistoquinina (CCK) en forma sulfatada tiene efectos estimuladores sobre la liberación *in vitro* de LH en fragmentos de hipófisis (Himick et al., 1993), si bien estos efectos resultan más evidentes en animales maduros que en animales en regresión.

3.2.6. Aminas

La noradrenalina (NA) estimula, a través de receptores α -1 adrenérgicos, la liberación de gonadotrofinas en la hipófisis (Chang et al., 1991, Trudeau, 1997), así como de GnRH en el área preóptica y en el hipotálamo (Yu y Peter, 1992, Trudeau, 1997). Aunque no existen referencias claras de la existencia de fibras noradrenérgicas en la hipófisis de teleósteos, esta innervación podría provenir del *locus coeruleus* (Kah et al., 1993).

La serotonina (5-hidroxitriptamina ó 5-HT) estimula la liberación de gonadotrofinas en el carpín dorado y en el salmón atlántico a través de una acción directa en la hipófisis sobre receptores 5-HT₂ (Somoza y Peter, 1991; Khan y Thomas, 1991, Trudeau, 1997). También estimula la liberación de GnRH en el área preóptica, hipotálamo anterior e hipófisis (Yu et al., 1991). En la hipófisis existen células 5-HT inmunoreactivas pero no parecen existir fibras 5-HT positivas (Kah et al., 1993), lo que induce a pensar que la serotonina de la hipófisis no procede de terminales nerviosos sino que es sintetizada por células de la hipófisis o captada por éstas a partir de la sangre.

La serotonina es el precursor de la melatonina, una amina secretada por el órgano pineal, pero también por la retina, y que representa la principal señal endocrina del sistema circadiano. El papel de la melatonina en el control de la secreción de gonadotrofinas y el ciclo reproductivo de peces está aún sujeto a cierta controversia. Así, la presencia de receptores de melatonina en la hipófisis ha sido descrita en algunas especies como el lucio (Gaildrat y Falcón, 2000) o el carpín dorado (Iigo et al., 1994), pero no en otras como el salmón atlántico (Ekström y Vanacek, 1992) o la trucha (Mazurais et al., 1999). Además, la melatonina carece de efectos sobre la secreción de gonadotrofinas en el carpín dorado (Somoza y Peter, 1991) pero estimula la secreción *in vivo* e *in vitro* de LH en un pez perciforme, *Micropogonias undulatus* (Khan y Thomas, 1996). Los receptores de melatonina se expresan también en centros

neuroendocrinos del área preóptica y el hipotálamo en la trucha (Mazurais et al., 1999) y la lubina (P. Herrera, J. Falcón, J.A. Muñoz-Cueto, datos no publicados), donde la melatonina puede ejercer acciones directas y/o indirectas sobre células neurosecretoras implicadas en el ciclo reproductivo.

4.- LAS GONADAS DE TELEOSTEOS Y LA PRODUCCION DE HORMONAS ESTEROIDES

4.1.- El ovario de Teleósteos

4.1.1.- Morfología del ovario de Teleósteos

El ovario de teleósteos muestra diferencias tanto interespecíficas, según la estrategia reproductiva, como intraespecíficas, según el momento del ciclo reproductivo (Nagahama, 1983). En general, la mayoría de los teleósteos poseen un ovario bilobulado, aunque en algunas especies ambos lóbulos llegan a fundirse en un órgano único durante el desarrollo temprano. Es un órgano hueco, que presenta una cavidad central o luz, cuyo tamaño varía según la fase del ciclo ovárico. El ovario está formado por un tejido de soporte o estroma ovárico y células de diversos tipos. Aparece recubierto de una membrana serosa peritoneal que constituye el epitelio germinal y en cuyo tejido conjuntivo laxo aparecen vasos sanguíneos y terminales nerviosos, así como tejido adiposo. Bajo la capa serosa se encuentra la túnica albugínea formada por tejido conjuntivo denso, y un manto muscular liso constituido por dos capas, una externa longitudinal y una interna más gruesa y circular. De esta capa muscular parten haces de tejido conjuntivo laxo, que se entremezclan con fibras musculares lisas hacia el interior de ovario y separan diferentes lamelas ováricas. Las lamelas ováricas son pliegues del estroma que se proyectan hacia la luz del ovario. Cada lamela ovárica aparece recubierta por un epitelio simple plano, que la separa de la luz. En el estroma aparecen distintos elementos celulares. Los folículos ováricos se originan a partir del epitelio germinal y están constituidos por las ovogonias u ovocitos, y por otras células somáticas de función diversa. Son las células de la granulosa y las células de la teca, que constituyen la envoltura folicular y que presentan un desarrollo más o menos sincrónico con las células de la línea germinal. El ovario se prolonga por un oviducto que termina en la papila o poro genital. En los salmónidos no existe oviducto y los óvulos son liberados directamente a la cavidad celómica, mientras que en teleósteos ovíparos, los ovocitos que se ovulan se mantienen hasta la puesta en la cavidad ovárica (Selman y Wallace, 1989; Wallace y Selman, 1990).

De acuerdo con el patrón de desarrollo de los ovocitos, se distinguen tres tipos de ovarios (Zanuy y Carrillo, 1987; Carrillo y Zanuy, 1993): el *ovario con sincronismo total* que contiene ovocitos en el mismo estado de desarrollo y es característico de teleósteos que ponen sólo una vez y mueren (salmónidos anadrómicos, anguilas catadrómicas). El *ovario con sincronismo por grupos* se caracteriza por la presencia de, al menos, dos poblaciones de ovocitos en diferente estado de desarrollo; suelen ser especies con una puesta anual y una estación de puesta relativamente corta tales como la lubina y la lisa. El *ovario asincrónico* (metacrónico) contiene ovocitos en todos los estados de desarrollo; este tipo de ovario se da en especies con puestas múltiples y una estación de puesta dilatada, como la dorada, el lenguado o el rodaballo.

4.1.2.-Fases del desarrollo del ovario

El término ovogénesis se ha prestado a cierta controversia. Así, para algunos autores, la ovogénesis *per se* incluye únicamente la transformación meiótica de las ovogonias en ovocitos primarios (Wallace y Selman, 1981). Posteriormente se ha utilizado el término ovogénesis para hacer referencia al desarrollo progresivo de las células germinales por acumulación de material de reserva (vitelo), que conduce a la formación de óvulos genéticamente aptos para ser fecundados y con una cantidad de reservas suficiente para mantener las primeras fases del desarrollo embrionario (Selman y Wallace, 1989; Wallace y Selman, 1990).

Para dividir la ovogénesis en diferentes estados se han empleado criterios como el tamaño de los ovocitos, la proporción de los diferentes tipos, la distribución y presencia de inclusiones celulares, la morfología de los cromosomas, etc. Tomando como referencia la presencia o no de gránulos de vitelo en el ovocito, la ovogénesis puede ser dividida en una fase primaria de crecimiento o previtelogénica y una fase secundaria o vitelogénica, durante la cual se acumula el vitelo, sustancias de reserva que proporcionarán energía a la larva durante sus primeras fases de desarrollo. Posteriormente, el ovocito sufre un proceso de maduración y ovulación con lo que el óvulo ya tiene capacidad de ser fecundado.

4.1.2.1.- Previtelogénesis

La previtelogénesis o crecimiento primario se caracteriza por la existencia de dos tipos celulares: *ovogonias* y *ovocitos primarios*. Las ovogonias, que proliferan por sucesivas divisiones mitóticas, presentan un núcleo grande con un nucleolo patente; se encuentran en el epitelio del lumen ovárico e incluso en la cresta germinal (Wallace y Selman, 1990). La transformación de las ovogonias en ovocitos primarios, se produce en el momento en que entran en la primera división meiótica, quedando detenidos en la fase de diplotene (Wallace y Selman, 1981). Las células somáticas extienden sus prolongaciones celulares separando los ovocitos contiguos y dando origen a la unidad folicular definitiva, con una capa folicular o granulosa y una lámina basal. El tejido conjuntivo vascularizado (teca) rodea entonces a los folículos y, más externamente, aparece una capa de epitelio ovárico.

Los ovocitos primarios, antes de iniciarse la vitelogénesis, experimentan una serie de transformaciones que afectan al núcleo, al nucleolo y al citoplasma: el ovocito comienza un período de crecimiento y aparecen múltiples nucleolos que suelen situarse en la periferia del núcleo (estado perinucleolar). En este estado la configuración filamentosa de los cromosomas es muy evidente y se asocia a un incremento de los procesos de transcripción (Wallace y Selman, 1990). En algunas especies se observa en este momento el *cuerpo de Balbiani* o *núcleo de vitelo amorfo*, que presenta dos porciones; el idiosoma y la sustancia palial. Su función no está bien definida pero podría estar implicado en la fabricación de orgánulos citoplasmáticos, ya que está compuesto por ribonucleoproteínas asociadas a mitocondrias, aparato de Golgi, retículo endoplasmático y cuerpos multivesiculares (Guraya, 1986). Durante esta fase el ovocito incrementa enormemente su volumen (aproximadamente 1000 veces) y aparece rodeado por células foliculares de aspecto escamoso (Wallace y Selman, 1981). Es en esta fase cuando las microvellosidades del ovocito contactan con las células foliculares. A continuación, se originan los

alveolos corticales, unas vesículas más o menos esféricas que se componen de mucopolisacáridos y glicoproteínas, con abundantes residuos de ácido siálico, evidenciándose que su componente mayoritario es una polisialo-glicoproteína de 200 kDa (Carrillo y Zanuy, 1993). Generalmente, aparecen formando un anillo alrededor de núcleo y son desplazados hacia la periferia del ovocito en estados más avanzados de la gametogénesis. Estos alveolos corticales liberan su contenido al espacio perivitelino en el momento de la fecundación, por lo que no se pueden considerar como vitelo. De ahí que la denominación de vesículas vitelinas que tradicionalmente se asignaba a estos alveolos corticales haya sido abandonada. En esta fase se originan también las vacuolas o glóbulos lipídicos, que están constituidos por lípidos de diferente naturaleza y de origen endógeno (Heming y Buddington, 1988).

4.1.2.2.- Vitelogénesis

La fase de crecimiento secundario o vitelogénesis se caracteriza por la acumulación de material de reserva en forma de vitelo. En vertebrados no mamíferos, los ovocitos crecen mientras están detenidos en la primera profase meiótica. El crecimiento del ovocito implica la captación de los derivados de una glicolipofosfoproteína hepática, la *vitelogenina*, y su incorporación en los gránulos de vitelo. Estos gránulos, de composición principalmente proteica, pueden contener también glucógeno y glicolípidos. La vitelogenina llega a la superficie del folículo a través de la circulación sanguínea y atraviesa la envoltura folicular y la membrana plasmática del ovocito. Es incorporada por micropinocitosis y llega al citoplasma del ovocito, donde se forman vesículas recubiertas de clatrina. Estas vesículas se van fusionando en cuerpos multivesiculares en los que la proteólisis de la vitelogenina dará lugar a lipovitelina, y fosvitina, que migran hacia el interior del ovoplasma (Carrillo y Zanuy, 1993). La localización de estos componentes del vitelo en el ovocito se ha realizado también por inmunocitoquímica, evidenciándose su presencia en los gránulos de vitelo (Silversand et al., 1993). En los huevos pelágicos, al final de la vitelogénesis se produce la coalescencia de los gránulos de vitelo en una o varias *gotas de grasa*, confiriendo al ovocito un aspecto transparente.

4.1.2.3.- Maduración y puesta

En muchas especies de teleósteos, la vitelogénesis cesa cuando los ovocitos inician la fase de maduración bajo estimulación hormonal (Wallace y Selman, 1990). No obstante, en otras especies, la captación de vitelogenina continúa durante la fase de maduración. La maduración del ovocito, que tiene lugar antes de la ovulación, se define como la fase en la que el ovocito continúa y completa la primera división meiótica, y progresa hasta la metafase de la segunda división meiótica. En algunas especies, el primer suceso indicativo de la maduración es la migración del núcleo o vesícula germinal hacia el polo animal, proceso que implica a elementos del citoesqueleto del ovocito. A continuación, tiene lugar la ruptura de la vesícula germinal, que indica el final de la profase de la primera división meiótica, la condensación de los cromosomas y la emisión del primer corpúsculo polar, que señala el final de la primera división meiótica (Nagahama, 1994). Los gránulos de vitelo y las vacuolas lipídicas sufren coalescencia y, en teleósteos marinos, se produce un enorme incremento del volumen ovocitario por hidratación. Como consecuencia de todos estos fenómenos, el ovocito adquiere un aspecto translúcido. En este proceso de hidratación parecen estar implicados iones inorgánicos y

componentes originados por la proteólisis del vitelo, jugando un importante papel, según parece, las uniones estrechas o *gap-junctions* existentes entre el ovocito y la envuelta folicular (Cerdá et al., 1993).

Un aspecto importante de la maduración lo constituye, precisamente, esta asociación entre las células foliculares y el ovocito. De hecho, la capacidad para madurar en respuesta a la hormona esteroide inductora de la maduración (MIH) parece coincidir con el momento en el que se restablecen las uniones estrechas entre las células foliculares y el ovocito (York et al., 1993). Se ha sugerido que estas uniones estrechas permiten el paso de nutrientes y factores hormonales desde las células foliculares al ovocito y que están implicadas en la parada de la meiosis durante la vitelogénesis y en la capacidad de los ovocitos para madurar (Cerdá et al., 1993; York et al., 1993).

La ovulación es la liberación del ovocito al lumen del ovario, o al celoma abdominal si no existe oviducto, y supone la separación del óvulo de la envuelta folicular por acción de enzimas proteolíticas y por contracción del foliculo. La fecundación será el estímulo que determine la finalización de la segunda división meiótica (Oshiro e Hibiya, 1981; Nagahama, 1994).

4.1.2.4.- Atresia

La atresia supone la degeneración y absorción de los ovocitos en cualquiera de las fases de su desarrollo. No obstante, la aparición de estos cuerpos atrésicos es más frecuente en la época de postpuesta. La atresia implica la hipertrofia de las células foliculares, la fragmentación de la capa radiada y su posterior digestión; el contenido celular se reabsorbe, las células foliculares se colapsan y aparece una masa celular o cuerpo atrésico, que terminará desapareciendo del ovario. La atresia es un proceso que ocurre de forma natural en el ovario, aunque también puede estar provocada por estrés ambiental o por deficiencias hormonales (Nagahama, 1994).

4.2.- El testículo de Teleósteos

4.2.1.- Morfología del testículo de Teleósteos

El testículo de teleósteos es generalmente un órgano alargado y bilobulado, asociado a la pared dorsal de la cavidad corporal (Zanuy y Carrillo, 1987). Como en otros vertebrados, se encuentra envuelto de una capa celular de tipo fibroso denominada túnica albugínea, y está compuesto de una porción intersticial y de otra porción lobular o tubular, según las especies. La porción intersticial se localiza entre los lóbulos testiculares y está compuesta por células intersticiales o *células de Leydig*, fibroblastos, vasos sanguíneos y vasos linfáticos. En la porción lobular o tubular se localizan las células de la línea germinal y las células somáticas o *células de Sertoli* (Nagahama, 1994).

4.2.2.- Fases del desarrollo testicular

La *espermatogénesis* en teleósteos tiene lugar en estructuras císticas del testículo delimitadas por las células de Sertoli. Cada ciste contiene células que parecen originarse por divisiones mitóticas a partir de una misma espermatogonia, ya que se encuentran en el mismo estadio de espermatogénesis y avanzan en su desarrollo de forma sincrónica (Nagahama, 1983). Generalmente, se habla de la existencia de distintos tipos de espermatogonias (espermatogonias A, B, etc), que se diferencian por la tasa de proliferación y el estado de desarrollo (Nagahama, 1994). Después de

experimentar una serie de divisiones mitóticas, las espermatogonias empiezan la división meiótica y se transforman en espermatocitos. También se consideran distintos tipos de espermatocitos según su tamaño, apariencia general y aspecto nuclear. Tras la segunda división meiótica, los espermatocitos se transforman en espermátidas.

La *espermioogénesis* consiste en la transformación de las espermátidas en espermatozoides. Los espermatozoides, que experimentan una serie de transformaciones morfológicas, aparecen en la luz del lóbulo testicular y viajan hacia el conducto espermático, donde adquieren su motilidad característica y la capacidad de fertilización. Este proceso es conocido también como *espermación*.

4.3.- Esteroidogénesis gonadal

El ovario y el testículo de teleósteos producen tres tipos de esteroides que son importantes para la reproducción:

- Estrógenos o esteroides C₁₈: 17-β estradiol (E₂), estrona.
- Andrógenos o esteroides C₁₉: testosterona (T), 11 cetotestosterona (11-KT), androstendiona. - Progestinas, progestágenos o esteroides C₂₁: pregnenolona, 17α-hidroxipregnenolona, progesterona, 17α-hidroxiprogesterona (17αHP), 17α,20β-dihidroxiprogesterona (17α20βDHP), 17α,20β-21 trihidroxiprogesterona (17α20β21THP).

La ruta biosintética de las hormonas esteroides gonadales presenta un precursor común, el colesterol. En las gónadas existen los enzimas necesarios para la síntesis de estos esteroides y para su transformación en toda una serie de intermediarios implicados en las distintas fases de la reproducción y en ciertos comportamientos sexuales.

4.3.1.- Síntesis y secreción de hormonas esteroides gonadales

La síntesis de esteroides por el ovario de teleósteos tiene lugar en las células somáticas que acompañan al ovocito, las células foliculares. Se ha descrito actividad esteroideogénica para las células de la teca y la granulosa de diferentes especies (Fostier et al., 1983; Kagawa et al., 1984; Nagahama, 1994). En los salmónidos, se ha propuesto un modelo de dos células para la esteroideogénesis. Según el momento del ciclo, las células de la teca producen y secretan esteroides como la T en vitelogénesis y la 17αHP en maduración, en respuesta a las gonadotrofinas. Estas células carecen de actividad aromatasa y 20βhidroxiesteroide-deshidrogenasa (20βHSD), por lo que son incapaces de producir E₂ y 17α20βDHP. Las células de la granulosa carecen de la maquinaria enzimática para sintetizar T y 17αHP, por lo que necesitan que las células de la teca les suministren estas hormonas, que son transformados en 17β-estradiol y 17α20βDHP, respectivamente. Las células de la granulosa poseen también receptores para la LH, que activaría los enzimas implicados en estos procesos, como son la aromatasa y la 20βHSD (Nagahama, 1994). Sin embargo, este modelo no parece ser válido para algunas especies como *Fundulus heteroclitus* y *Oryzias latipes* (Onitake e Iwamatsu, 1986; Petrino et al., 1989a, b). En estas especies, las células de la granulosa son las principales implicadas en la síntesis de esteroides gonadales y la producción de E₂ y 17α20βDHP no requiere la implicación de los dos tipos celulares (teca y granulosa). Las células de la teca carecen de actividad aromatasa y secretan

principalmente T; las células de la granulosa poseen todos los enzimas necesarios para la síntesis de T, 17α HP, E_2 y 17α 20 β DHP (Lin et al., 1991).

La síntesis de hormonas esteroides en el testículo de teleósteos tiene lugar, principalmente, en las células de Leydig que poseen distintos enzimas implicados en la esteroidogénesis y características ultraestructurales propias de células productoras de esteroides (Nagahama, 1983). Si bien la capacidad esteroidogénica de las células de Sertoli es aún incierta, en ciertas especies se han observado características bioquímicas, histoquímicas y ultraestructurales que permiten sospechar su implicación en la síntesis de esteroides, y en concreto de progestinas como la 17α , 20 β DHP (Nagahama, 1983).

En la mayoría de las especies estudiadas, los niveles plasmáticos de esteroides gonadales presentan variaciones durante su ciclo reproductivo (Young et al., 1983b; Scott et al., 1984; Sumpter y Scott, 1989; Prat et al., 1990; Pankhurst y Carragher, 1991; Rinchard et al., 1993). Así, en numerosas especies los niveles de E_2 , T y 11KT aumentan gradualmente durante la fase de crecimiento ovocitario y la espermatogénesis, alcanzando un máximo en el período de prepuesta (Ouchi et al., 1988a, b; Mayer et al., 1990; Prat et al., 1990). En especies como la dorada o la lubina se ha descrito la existencia de patrones bimodales en los niveles de esteroides (Kadmon et al., 1985; Prat et al., 1990). Generalmente, los niveles de 17α 20 β DHP y/u otras progestinas se elevan notablemente durante la fase de maduración-puesta en diversas especies, lo que induce a pensar que este esteroide C_{21} es la hormona inductora de la maduración (MIH) (Nagahama, 1994).

Los niveles de esteroides en plasma no solo experimentan variaciones estacionales ya que se han descrito ritmos diarios de E_2 en el besugo y la dorada (Matsuyama et al., 1988; Zohar et al., 1988), ciclos semilunares en *F. heteroclitus* (Greeley et al., 1988) y ritmos semanales en otras especies (Pankhurst y Carragher, 1991). Previamente al establecimiento de estas variaciones cíclicas, los esteroides juegan, igualmente, un papel esencial durante la diferenciación y el desarrollo temprano de las gónadas (Schulz et al., 1993).

4.4.- Los receptores de hormonas esteroides

Los receptores de hormonas esteroides pertenecen a una superfamilia de factores de transcripción inducidos por un ligando, que también incluye a los receptores de hormonas tiroideas, ácido retinoico y Vitamina D3. El complejo hormona-receptor modula la transcripción génica de forma directa, mediante la unión a un elemento específico *cis*, o de forma indirecta, mediante la interacción con otras proteínas nucleares implicadas en mecanismos transcripcionales génicos específicos (Evans, 1988).

En la última década, muchos cDNAs de receptores hormonales han sido clonados y su análisis ha mostrado que poseen una estructura similar. Así, presentan una región N-terminal variable (dominio A/B) implicada en la transcripción, una región central de unión al ADN (dominio C) altamente conservada y organizada en forma de dos hélices estabilizadas por zinc, una región hidrofóbica, relativamente conservada (dominio E) que interviene en la unión a la hormona y en el control de la transcripción, y una secuencia corta, pobremente conservada, en el extremo carboxilo (dominio F) (Evans, 1988; Beato, 1989; Power et al., 1992; Le Roux et al., 1992). Se ha clonado también el receptor de estrógenos de la trucha arcoiris y muestra una organización

similar a la descrita previamente (Pakdel et al., 1990; Le Roux et al., 1992). El clonaje de los genes del receptor de progesterona, de estrógenos y de andrógenos en diversas especies ha revelado una organización similar, con 8 ó 9 exones y regiones de unión intrón-exón similares (Huckaby et al. 1987; Ponglikitmongkol et al. 1988; Kuiper et al. 1989).

La localización celular de los receptores de esta superfamilia está sujeta a bastante controversia. En mamíferos se ha propuesto la existencia de receptores de estrógenos tanto en el citoplasma como en el núcleo celular (Power et al., 1992; Smith y Toft, 1993). Sin embargo, en la trucha arcoiris, utilizando anticuerpos contra el dominio de unión a la hormona, la inmunorreactividad aparece confinada en el núcleo celular. Aunque estas discrepancias permanecen sin resolver, parece ser que el estado endocrino del individuo y los epitopos contra los cuales están dirigidos los anticuerpos resultan de gran importancia para la localización celular de los receptores (Anglade et al., 1994).

En cuanto a la localización anatómica, estudios mediante autorradiografía, hibridación *in situ* e inmunocitoquímica han evidenciado la presencia de receptores de esteroides principalmente en el hígado, la hipófisis, el cerebro (hipotálamo mediobasal, telencéfalo ventral, y área preóptica anteroventral) y las gónadas de peces (Kim et al. 1978; Salbert et al., 1991; Anglade et al., 1994). En peces, a diferencia de mamíferos, el hígado es el principal tejido diana de los estrógenos, donde éstos controlan la síntesis de las proteínas que constituirán el vitelo de los ovocitos. En la trucha, los estrógenos inducen un rápido aumento en los niveles de ARNm del receptor de estrógenos hepático y determinan un fuerte incremento en la síntesis de vitelogenina (Pakdel et al. 1989, 1991). Como veremos, sobre estos tejidos se ejercen las principales acciones de los esteroides gonadales.

4.5.- Acción fisiológica de las hormonas esteroides gonadales

La acción de las hormonas esteroides requiere la entrada de las hormonas por difusión pasiva en la célula diana, su unión a un receptor proteico al que inducen un cambio conformacional y, por último, la acción directa de este complejo hormona-receptor sobre el ADN, que determina la modulación de la expresión génica (Power et al., 1992). Esta modulación puede implicar la activación o la inhibición de determinados genes en la célula diana (Beato, 1989; Fuller, 1991). No obstante, estudios recientes han puesto de manifiesto que los esteroides sexuales pueden tener efectos rápidos a nivel de membrana, probablemente activando una cascada de señales intracelulares que conducen a procesos de fosforilación (Power et al., 1992).

En peces teleósteos, los esteroides gonadales desempeñan un importante papel en los procesos de gametogénesis. Estas acciones pueden ser ejercidas directamente sobre las gónadas o pueden ser el resultado de una acción indirecta de estas hormonas sobre el hígado, la hipófisis y/o el cerebro, que poseen también receptores de esteroides (Pakdel et al., 1989; Salbert et al., 1991; Valotaire et al., 1993; Anglade et al., 1994). Así, como sucede en otros vertebrados, las hormonas esteroides ejercen una regulación mediante retroalimentación sobre el eje cerebro-hipófisis-gónada. Esta retroalimentación, tanto positiva como negativa, incide sobre la síntesis y secreción de gonadotrofinas y de GnRH (Kobayashi y Stacey, 1990).

A continuación vamos a analizar brevemente la acción de los esteroides a nivel de las gónadas y estructuras sexuales secundarias, a nivel hepático, y a nivel cerebral e hipofisario.

4.5.1.- Acción sobre el ovario y estructuras sexuales secundarias

Las hormonas esteroides gonadales inciden de forma directa o indirecta sobre los procesos de ovogénesis, esto es, la proliferación de las ovogonias, el crecimiento, la maduración de los ovocitos y la emisión de los óvulos.

Si bien la síntesis de la vitelogenina hepática es dependiente de E₂, la incorporación al ovocito no parece estar regulada de forma directa por E₂ (Tyler, 1991; Shibata et al., 1991). El proceso de la maduración de los ovocitos (división meiótica, ruptura de la vesícula germinal) está claramente controlado por esteroides C₂₁. Numerosos estudios señalan a la 17 α 20 β DHP como la principal hormona inductora de la maduración (MIH) en salmónidos y en otros teleósteos (Yamauchi et al., 1984; Petrino et al., 1993; Nagahama, 1994). Sin embargo, en especies como *Micropogonias undulatus* y *Cynoscion nebulosus*, la 17 α 20 β 21-trihidroxi-4-pregnen-3-ona parece ser la MIH funcional (Thomas y Trant, 1989). Además existen metabolitos de estos esteroides que son potentes estimuladores de la ruptura de la vesícula germinal, como los 5 α y 5 β pregnanos (Kime et al., 1992). Estas acciones serán consideradas de forma integrada en apartados posteriores.

Los esteroides también estimulan la división celular en el útero y en el oviducto y aumentan la transcripción de ciertos genes, como el de la ovoalbúmina del oviducto de pollo (O'Malley et al., 1979; Fink, 1988).

4.5.2.- Acción sobre el hígado

El E₂ induce cambios metabólicos y altera el aporte de metabolitos en el hígado para estimular la síntesis hepática de vitelogenina en las hembras de teleósteos (De Vlaming et al., 1980; Norberg y Haux, 1985; Kishida et al., 1992; Kishida y Specker, 1993). En tilapia, *Oreochromis mossambicus*, se ha evidenciado que el E₂ induce la síntesis de dos formas de vitelogenina, que presentan niveles plasmáticos diferentes y que son captadas por el ovocito (Kishida y Specker, 1993). Si bien se había considerado la vitelogenina como una proteína exclusivamente de las hembras, se ha visto que está presente en machos de diversas especies y que, en estos, el E₂ también induce variaciones en los niveles de vitelogenina (Copeland et al., 1986; Ding et al., 1989).

Además de la inducción de la síntesis y secreción de vitelogenina, el E₂ presenta otros efectos metabólicos en el hígado. En algunas especies se ha comprobado que el E₂ altera el metabolismo de carbohidratos, estimulando la degradación del glucógeno hepático, que aporta glucosa para la oxidación aeróbica en diversos tejidos. Así, se ha observado un incremento de los enzimas metabólicos de la glucólisis y un descenso del glucógeno hepático en peces tratados con E₂ (Petersen et al., 1983; Ng et al., 1984). El descenso del glucógeno hepático parece estar relacionado, entre otros aspectos, con los requerimientos energéticos para la síntesis de vitelogenina (Korsgaard y Mommsen, 1993). En los salmónidos también se ha estudiado el efecto del E₂ sobre el metabolismo de carbohidratos y proteínas. En estudios realizados en hembras migratorias (vitelogénicas) se ha observado una elevada actividad gluconeogénica en el hígado (Mommsen et al., 1980). Por otro lado, en la trucha el E₂ afecta al metabolismo proteico, induciendo la conversión de

aminoácidos en glucosa y aumentando el potencial hepático para la gluconeogénesis (Whiting y Wiggs, 1978). Durante el proceso de síntesis de vitelogenina, el hígado incorpora precursores extrahepáticos, en forma de aminoácidos, que aportan carbonos para la gluconeogénesis y unidades estructurales para la formación de proteínas (Korsgaard y Mommsen, 1993). Por último, estudios recientes señalan que las proteínas constituyentes de la zona radiata del ovocito no son de origen endógeno, sino que son sintetizadas en el hígado en respuesta a la estimulación por E_2 (Oppen-Berntsen et al., 1992).

4.5.3.- Acción sobre el cerebro y la hipófisis

En peces teleósteos, los esteroides sexuales atraviesan la barrera hematoencefálica y, tal como se ha descrito para otros factores, controlan la secreción de gonadotrofinas actuando directamente sobre la hipófisis y/o modulando los efectos de ciertos factores hipofisiotrópicos cerebrales, como la GnRH, la dopamina y el GABA (Peter et al., 1991; Saligaut et al., 1992; Kah et al., 1993; Trudeau et al. 1993).

Experimentos de castración y de administración de esteroides aportan pruebas sobre la retroalimentación negativa que ejercen los esteroides gonadales (andrógenos y estrógenos) en la liberación de gonadotrofinas (Kobayashi y Stacey, 1990). Durante los estadios tempranos de recrudescencia gonadal, E_2 parece ejercer un efecto inhibitorio en la producción de FSH en machos de salmón coho, disminuyendo la transcripción de su subunidad β (Swanson y Dickey, 1996). En cambio, se ha descrito la estimulación de la transcripción de la subunidad β de la LH por T y E_2 en machos y hembras de la misma especie (Swanson y Dickey, 1996). Los tratamientos con estradiol o testosterona en el carpín dorado postpuberal elevan la producción de LH estimulada por GnRH (Trudeau et al., 1991). Al parecer, el inicio de la primera recrudescencia gonadal está influido de forma significativa por esta retroalimentación positiva de los esteroides en la regulación de la secreción de las gonadotrofinas. Existe, pues, una retroalimentación tanto positiva como negativa por parte de los esteroides gonadales. Estas acciones inciden sobre el número y la afinidad de los receptores de GnRH, la degradación enzimática de GnRH, los niveles de GABA, el metabolismo catecolaminérgico y la regulación catecolaminérgica de la liberación de gonadotrofinas (Goos, 1987; Trudeau et al., 1991; Kah et al., 1992; Klungland et al., 1993). Por otro lado, existen evidencias de que los esteroides regulan la expresión de sus propios receptores en las células hipotalámicas e hipofisarias, propiedad que parece común a las sustancias con receptores nucleares (Salbert et al., 1993).

Asimismo, son conocidos los efectos que los andrógenos tienen sobre los comportamientos sexuales. La mayoría de las especies tienen actividad aromatasa y receptores de andrógenos muy extendidos en áreas cerebrales extrahipotalámicas, principalmente en áreas de integración sensorial implicadas en el procesamiento de información olfativa, visual, auditiva, mecanosensorial y electrosensorial. Estas áreas reciben inervación GnRH y parecen relacionarse con actividades tales como el cortejo y la puesta (Callard y Gelinás, 1991; Kah et al., 1993).

Además, se han descrito elevados niveles de testosterona y $17\alpha 20\beta$ DHP en el plasma durante el cortejo en *Chromis dispilus*, mientras que la fase de nidación, en esta especie, se caracteriza por niveles bajos de ambas hormonas (Pankhurst y Barnett, 1993). En algunas especies territoriales, la

defensa del territorio por los machos se asocia con incrementos transitorios en los niveles de andrógenos en sangre, con niveles particularmente altos en aquellos machos que establecían nuevos territorios (Cardwell y Liley, 1990).

Además de los efectos indicados anteriormente, denominados efectos a largo tiempo o efectos genómicos, los *neuroesteroides* o esteroides sintetizados en el cerebro podrían tener efectos rápidos mediados por receptores de membrana, si bien estos efectos aún no se han evidenciado en peces (Kah et al., 1993).

5.- REGULACION HORMONAL DEL CICLO REPRODUCTIVO DE PECES TELEOSTEOS

El control hormonal de la gametogénesis y la esteroideogénesis gonadal no puede ser considerados de forma separada ya que ambos procesos están estrechamente relacionados. Así, en términos generales, las gonadotrofinas producidas en respuesta a factores cerebrales actúan sobre las gónadas induciendo la síntesis de hormonas esteroides, que a su vez pueden actuar sobre el hígado, la hipófisis, el cerebro y la propia gónada, modulando los procesos de crecimiento gonadal. A su vez, conforme avanza la gametogénesis se produce un cambio en la ruta de biosíntesis de esteroides, que determina la producción de factores maduracionales que modulan las etapas finales del desarrollo gonadal (Nagahama, 1994). Estos procesos serán considerados en detalle a continuación.

5.1.- Control hormonal de la gametogénesis y la esteroideogénesis ovarica

Si bien, en principio se creía que las primeras fases de crecimiento del ovario y la multiplicación de las ovogonias (es decir, las etapas previtelogénicas) no estaban sometidas a control hormonal, cada vez son mayores las evidencias que señalan que esto no es cierto. Así, el tratamiento con andrógenos en hembras impúberes provoca un aumento en los niveles de gonadotrofinas hipofisarias y se ha observado la existencia de niveles elevados de E_2 en hembras en postpuesta, que podrían estar relacionados con la proliferación de las ovogonias (Yaron y Levavi-Zermonski, 1986). Además, en algunos teleosteos se han observado picos en la producción de gonadotrofinas durante la previtelogénesis que pueden tener relación con el control de las mitosis ovogoniales y de las meiosis ovocitarias (Zohar et al., 1982).

En cambio, el control hormonal de las fases de vitelogénesis, maduración y puesta, y la esteroideogénesis ovárica en cada una de estas fases ha sido objeto de estudios mucho más exhaustivos. Una excelente revisión de todos estos aspectos ha sido realizada por Nagahama (1994). Así se ha propuesto que las gonadotrofinas actúan sobre receptores presentes en las células de la teca y estimulan en ellas la producción de T. Esta acción parece implicar la activación del sistema adenilato ciclasa y la actuación del AMPc como segundo mensajero. Las células de la teca carecen de actividad aromatasa y por tanto no pueden transformar la T en E_2 . Sin embargo, esta actividad aromatasa si está presente en las células de la granulosa, que son capaces de producir E_2 a partir de la T suministrada por las células de la teca. Las células de la granulosa de los folículos vitelogénicos también poseen receptores para gonadotrofinas y se ha sugerido que en algunas especies de

teleósteos las gonadotrofinas pueden inducir la actividad aromatasas en estas células vía AMPc (Nagahama et al., 1991). Como dijimos anteriormente, este modelo de dos células no es válido para especies como *Fundulus heteroclitus* u *Oryzias latipes* en los que las células esteroidogénicas de la teca no son muy evidentes y las células de la granulosa poseen todos los enzimas necesarios para la síntesis de esteroides (Onitake e Iwamatsu, 1986; Petrino et al., 1989a, b). El E₂ producido por las células de la granulosa es transportado por la circulación al hígado, donde estimula la síntesis y secreción de vitelogenina. Esta vitelogenina es transportada al ovocito e incorporada por micropinocitosis, y es responsable del enorme crecimiento del ovocito durante la fase vitelogénica.

Como vimos anteriormente, la incorporación de la vitelogenina al ovocito no parece estar regulada de forma directa por E₂ sino por otras hormonas como la FSH, la insulina, las hormonas tiroideas y la GH (Tyler, 1991; Shibata et al., 1991).

La maduración ovocitaria depende de tres factores principales: las gonadotrofinas, una hormona inductora de la maduración (MIH) y un factor promotor de la maduración (MPF), que actúan de forma secuencial (Nagahama, 1987).

En salmónidos se ha propuesto también un modelo de dos células para la esteroidogénesis gonadal durante la fase de maduración-puesta, que parece extensible a otros teleósteos (Nagahama, 1994). Según este modelo, la LH interaccionaría con receptores de las células de la teca estimulando la síntesis de una progestina, la 17 α -hidroxiprogesterona (17 α HP). Este proceso implica la activación de la adenilato ciclasa y la producción de AMPc. La 17 α HP atraviesa la membrana basal y es convertida en 17 α , 20 β dihidroxi-4-pregnen-3-ona (17 α , 20 β DHP) en las células de la granulosa. Esta conversión parece estar modulada por la acción sobre las células de la granulosa de las gonadotrofinas, que estimulan la síntesis y la actividad de la enzima responsable del paso de 17 α HP a 17 α ,20 β DHP, la 20 β hidroxisteroide deshidrogenasa (20 β HSD).

El tránsito de la vitelogénesis a la maduración implica, por tanto, un cambio en la ruta esteroidogénica en el ovario que le lleva de producir T y E₂ a producir progestinas como la 17 α HP o la 17 α ,20 β DHP. Este cambio parece estar determinado por un descenso en la actividad aromatasas y por un aumento simultáneo en la actividad 20 β HSD en las células de la granulosa (Kanamori et al., 1988; Nagahama, 1994). La 17 α ,20 β DHP parece representar la hormona inductora de la maduración (MIH) en salmónidos y otros teleósteos ya que presenta elevados niveles durante esta fase y tiene potentes efectos en la inducción de la ruptura de la vesícula germinal (Young et al., 1983a; Nagahama et al., 1983). Sin embargo, en otros teleósteos como *Micropogonias undulatus* o *Cynoscion nebulosus* es otra progestina, la 17 α ,20 β ,21 trihidroxi-4-pregnen-3-ona, la que parece desempeñar funciones de MIH (Trant y Thomas, 1989; Thomas y Trant, 1989).

Si bien la mayoría de las acciones de las hormonas esteroides suponen la interacción de las mismas con receptores citoplasmáticos o nucleares, la MIH actúa sobre receptores presentes en la membrana plasmática de los ovocitos (Yoshikuni et al., 1993). No obstante, la capacidad del ovocito para madurar parece no depender directamente de un aumento en la producción de MIH sino de un incremento en la concentración de receptores

de MIH inducido por gonadotrofinas. En el carpín dorado, la interacción de la MIH con su receptor de membrana induce la síntesis de una proteína, la ciclina B, que se une a otra proteína existente en el ovocito, la cdc2 kinasa. Estas dos proteínas constituyen el factor promotor de la maduración (MPF), que se activa cuando se fosforila un residuo de treonina de la cdc2 kinasa y determina la ruptura de la vesícula germinal y la maduración final del ovocito (Nagahama, 1994). Procesos similares pueden ser responsables de la maduración ovocitaria en otros teleósteos.

5.2.- Control hormonal de la gametogénesis y la esteroidogénesis testicular

En teleósteos, se ha descrito la existencia de niveles elevados de andrógenos durante la fase de espermatogénesis (Fostier et al., 1983). Estos andrógenos son principalmente la testosterona (T), la 11 cetotestosterona (11KT) y/o la 11 β hidroxitestosterona, variando el andrógeno dominante de unas especies a otras. Recientemente se ha propuesto un modelo de regulación hormonal de la espermatogénesis, basado en los estudios realizados en el testículo de la anguila japonesa (Nagahama, 1994). Según este modelo, las gonadotrofinas inducen en las células de Leydig la producción de 11KT, que atraviesa la membrana basal y estimula la producción en las células de Sertoli de un factor no esteroideo denominado Activina B. La activina B será el factor responsable de la inducción de las mitosis en las espermatogonias y de su transformación en espermatoцитos.

En salmónidos, se ha observado la existencia de bajos niveles de 17 α ,20 β DHP durante la fase de espermatogénesis y de elevados niveles de esta progestina durante la maduración final del testículo y durante la espermiación (Ueda et al., 1983). Esto sugiere que al menos en algunos teleósteos, la 17 α ,20 β DHP juega un papel en la maduración de los espermatozoides. Así, se ha sugerido que las gonadotrofinas actúan sobre las células somáticas del testículo, donde estimulan la producción de 17 α HP. Este precursor es transportado a los espermatozoides, que poseen actividad enzimática 20 β HSD y lo convierten en 17 α ,20 β DHP. Esta progestina parece la responsable de la maduración final, la adquisición de la movilidad de los espermatozoides y la capacidad de fertilización, a través de una serie de acciones que tienen lugar en el conducto espermático. Estas acciones implican una elevación del pH en el conducto espermático y un incremento en los niveles de AMPc en el interior de los espermatozoides (Nagahama, 1994).

BIBLIOGRAFIA

- **Adams, B.A., Vickers, E.D., Warby, C., Park, M., Fischer, W.H., Grey Craig, A., Rivier, J.E., Sherwood, N.M. 2002.** Three forms of gonadotropin-releasing hormone, including a novel form, in a basal salmonid, *Coregonus clupeaformis*. *Biol. Reprod.* 67: 232-239.
- **Adams, B.A., Tello, J.A., Erchegeyi, J., Warby, C., Hong, D.J., Akinsanya, K.O., Mackie, G.O., Vale, W., Rivier, J.E., Sherwood, N.M. 2003.** Six novel gonadotropin-releasing hormones are encoded as triplets on each of two genes in the protochordate, *Ciona intestinalis*. *Endocrinology* 144 (), pp. 1907–1919.
- **Amano, J., y Kobata, A., 1993.** Direct interaction of the sialic acid residue of human lutropin and chorionic gonadotropin with target cells is necessary for the full expression of their hormonal action. *Arch. Biochem. Biophys.* 305: 618-621.
- **Amano, M., Oka, Y., Yamanome, T., Okuzawa, K., Yamamori, K., 2002.** Three GnRH systems in the brain and pituitary of a pleuronectiform fish, the barfin flounder *Verasper moseri*. *Cell Tissue Res.* 309, 323-329.
- **Amoss, M., Burgus, R., Blackwell, R., Vale, W., Fellows, R., y Gullemin, R., 1971.** Purification, amino acid composition and N-terminus of the hypothalamic luteinizing releasing factor (LRF) of ovine origin. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 44: 205-210.
- **Andersson, E., Fjellidal, P.G., Klenke, U., Vikingstad, E., Taranger, G.L., Zohar, Y., Stefansson, S.O., 2001.** Three forms of GnRH in the brain and pituitary of the turbot, *Scophthalmus maximus*: immunological characterization and seasonal variation. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 129, 551-558.
- **Anglade, I., 1994.** Étude morphofonctionnelle des systèmes neuroendocriniens impliqués dans le contrôle de la fonction gonadotrope chez les poissons osseux. *Tesis Doctoral. Universidad de Bourdeaux I,*
- **Anglade, I., Tramu, G., y Kah, O., 1991.** Neuroanatomical substrate for dopamine-sGnRH (gonadotropin-releasing hormone) interactions in the forebrain of the goldfish (*Carassius auratus*). *En: Reproductive Physiology of Fish. Scott, A.P., Sumpter, J.P., Kime, D.E., y Rolfe, M.S., Eds. FishSymp 91. Sheffield. p.60.*
- **Anglade, I., Zandbergen, H.A., y Kah, O., 1993.** Origin of the pituitary innervation in the goldfish. *Cell. Tiss. Res.* 273: 345-355.
- **Anglade, I., Pakdel, F., Bailhache, T., Petit, F., Salbert, G., Jego, P., Valotaire, Y and Kah, O. 1994.** Distribution of estrogen receptor-immunoreactive cells in the brain of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Neurocytol.*, 6: 573-583.
- **Aparicio, S., Chapman, J., Stupka, E., Putnam, N., Chia, J.M., Dehal, P., Christoffels, A., Rash, S., Hoon, S., Smit, A., Gelpke, M.D., Roach, J., Oh, T., Ho, I.Y., Wong, M., Detter, C., Verhoeef, F., Predki, P., Tay, A., Lucas, S., Richardson, P., Smith, S.F., Clark, M.S., Edwards, Y.J., Doggett, N., Zharkikh, A., Tavtigian, S.V., Pruss, D., Barnstead, M., Evans, C., Baden H., Powell J., Glusman G., Rowen L., Hood L., Tan Y.H, Elgar G., Hawkins T., Venkatesh B., Rokhsar D., Brenner S., 2002.** Whole-genome shotgun assembly and analysis of the genome of *Fugu rubripes*. *Science* 297,1301-1310.

- **Barry, J., Hoffman, G.E., y Wray, S., 1985.** LHRH-containing systems. En: Handbook of chemical neuroanatomy. Vol. 4: GABA and neuropeptides in CNS, Part I. A Björklund, T. Hökfelt (Eds.). Elsevier, pp.166-215.
- **Batten, T.F.C., Ingleton, P.M. 1987.** The hypothalamus and the pituitary gland. En: Fundamentals of Comparative Vertebrate Endocrinology. I. Chester-Jones, P.M. Ingleton y J.G. Phillips (Eds.) Plenum Press. New York. pp. 285-409.
- **Batten TF, Cambre ML, Moons L, Vandesande F. 1990.** Comparative distribution of neuropeptide-immunoreactive systems in the brain of the green molly, *Poecilia latipinna*. J. Comp. Neurol. 302: 893-919.
- **Beato, M., 1989.** Gene regulation by steroid hormones. Cell., 56: 335-344.
- **Bogerd, J., Li, K.W., Janssen-Dommerholt, C., Goos, H. 1992.** Two gonadotropin-releasing hormones from African catfish (*Clarias gariepinus*). Biochem. Biophys. Res. Commun. 187:127-134.
- **Breton, B. 1968.** Contribution a l'étude, l'isolement and dosage des gonadotropins des poissons. *Tesis Doctoral*
- **Breton, B., y Billard, R. 1977.** Effects of photoperiod and temperature on plasma gonadotropin and spermatogenesis in the rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson. Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys. 17 (3a): 331-340.
- **Breton, B., y Sambroni, E. 1989.** Evolution du nombre des récepteurs gonadotropes ovariens au cours du cycle reproducteur annuel chez la truite fario *Salmo trutta L.* C.R. Acad. Sci. (Paris) Sér. III. 308: 495-500.
- **Breton, B. Weil, C., Jalabert, B., y Billard, R. 1972.** Activité réciproque des facteurs hypothalamiques de Bélier (*Ovis aries*) et des poissons téléostéens sur la sécrétion *in vitro* des hormones gonadotropes c-HG et LH respectivement par des hypophyses de Carpe et de Bélier. C.R. Acad. Sci. (Paris) Sér. III. 274: 2530-2533.
- **Breton, B., Micolajczyk, T., Poppek, W., Bienarz, K., y Epler, P., 1991.** Neuropeptide Y stimulates *in vitro* gonadotropin secretion in teleost fish. Gen. Comp. Endocrinol., 84: 277-283.
- **Burzawa-Gerard, E. 1971.** Purification d'une hormone gonadotrope hypophysaire de poisson téléostéen, la carpe (*Cyprinus carpio L.*). *Biochimie* 53: 545-552.
- **Burzawa-Gerard, E., y Fontaine, Y. A. 1966.** Sur le probleme de l'unicite on de la dualite de l'hormone gonadotrope hypophysaire d'un téléostéen, la carpe. Etude du poids moléculaire de la ou des substances actives. Ann. Endocr. (Paris), Suppl.
- **Burzawa-Gerard, E., y Fontaine, Y. A. 1972.** The gonadotropins of lower vertebrates. Gen. Comp. Endocrinol. 3: 715-728.
- **Callard, G.V., y Gelinás, D., 1991.** Intracellular and neuroanatomical location of aromatase and androgen receptors in goldfish (*Carassius auratus*) brain: basis of functional interactions. En: *Reproductive Physiology of Fish*. Soctt, A.P., Sumpter, J.P., Kime, D.E., y Rolfe, M.S., Eds., FishSymp. Sheffield. pp 218-220.
- **Cambré, M. L., Verdonck, W., Ollevier, F., Vandesande, F., Batten, T. F. C. y Kühn, E. R. 1986.** Immunocytochemical identification and localization of the different cell types in the pituitary of the seabass (*Dicentrarchus labrax*). Gen. Comp. Endocrinol. 61: 368-375.

- **Campbell, C.M., e Idler, D.R., 1976.** Hormonal control of vitellogenesis in hypophysectomized winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus* Walbaum). Gen. Comp. Endocrinol., 28: 143-150.
- **Campbell, C.M., e Idler, D. R. 1977.** Oocyte maturation and ovulation induced in hypophysectomized winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) by preparation from pituitary glands of American plaice (*Hippoglossoides platessoides*). J. Fish. Res. Board Canad. 34: 2151-2155.
- **Cardwell, J.R., y Liley, N.R., 1990.** Androgen control of social status in males of a wild population of stoplight parrotfish, *Saprisoma viride* (Scaridae). Horm. Behav. 25: 1.18.
- **Carolsfeld, J., Powell, J.F., Park, M., Fischer, W.H., Craig, A.G., Chang, J.P., Rivier, J.E., Sherwood, N.M. 2000.** Primary structure and function of three gonadotropin-releasing hormones, including a novel form, from an ancient teleost, herring. Endocrinology 141:505-512.
- **Carrillo, M., y Zanuy, S., 1993.** Fisiología de la reproducción: Fisiología de la reproducción de los Teleósteos. En "*Acuicultura marina: fundamentos biológicos y tecnología de la producción*" pp:125-142. Coord. F. Castelló Orvay. Ed. Universitat de Barcelona.
- **Cerdá, J.L., Petrino, T.R., y Wallace, R.A., 1993.** Functional heterologous gap junctions in *Fundulus* ovarian follicles maintain mitotic arrest and permit hydration during oocyte maturation. Dev. Biol. 160: 228-235.
- **Cerda-Reverter, J.M., Sorbera, L.A., Carrillo, M., Zanuy, S. 1999.** Energetic dependence of NPY-induced LH secretion in a teleost fish (*Dicentrarchus labrax*). Am J Physiol. 277:1627-1634.
- **Cerda-Reverter, J.M., Anglade, I., Martinez-Rodriguez, G., Mazurais, D., Munoz-Cueto, J.A., Carrillo, M., Kah, O., Zanuy, S. 2000.** Characterization of neuropeptide Y expression in the brain of a perciform fish, the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). J. Chem. Neuroanat. 19(4):197-210
- **Cicero, T.J., Schmoeker, P.F., Meyer, E.R., y Miller, B.T., 1985.** Luteinizing hormone releasing hormone mediates naloxone's effects on serum luteinizing hormone in normal and morphinesensitized rats. Life Sci., 37: 467-474.
- **Conn, P.M., Crowley, W.F. Jr. 1994.** Gonadotropin-releasing hormone and its analogs. Annu. Rev. Med. 45:391-405.
- **Cooke, B. A., Dirami, G., Chaudry, L., Choi, M. S. K., Abayasekara, D. R. E., y Philipp, L. 1991.** Release of arachidonic acid and the effects of corticosteroids on steroidogenesis in rat testis Leydig cells. J. Steroid Biochem. Molec. Biol. 40: 465- 471.
- **Copeland, P.A. y Thomas, P., 1989.** Purification of maturational gonadotropin from Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*) and development of a homologous radioimmunoassay. Gen. Comp. Endocrinol. 73: 425-441.
- **Copeland, P.A., y Thomas, P., 1992.** Isolation of maturational gonadotropins from spotted seatrout (*Cynoscion nebulosus*) and development of a β -subunit-directed radioimmunoassay for gonadotropin measurement in sciaenid fishes. Gen. Comp. Endocrinol., 88, 100-110.
- **Copeland, P. A., y Thomas, P. 1993.** Isolation of gonadotropin subunits and evidence for two distinct gonadotropins in Atlantic Croaker (*Micropogonias undulatus*). Gen. Comp. Endocrinol. 91: 115-125.
- **Copeland, P.A., Sumpter, J.P., Walker, T.K., y Croft, M., 1986.** Vitellogenin levels in male and female rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) at various stages of the reproductive cycle. Comp. Biochem. Physiol., 83B:487-493.

- **Chang, J.E. y Peter, R.E., 1983.** Effects of pimozide and Des Gly¹⁰, (D Ala⁶) Luteinizing hormone-releasing hormone ethylamide on serum gonadotropin concentration, germinal vesicle migration, and ovulation in female goldfish, *Carassius auratus*. Gen Comp. Endocrinol., 52: 30-37.
- **Chang, J.P., Cook, R.E., y Peter, R.E., 1983.** Influence of catecholamines on gonadotropin secretion in goldfish, *Carassius auratus*. Gen. Comp. Endocrinol., 49: 22-31.
- **Chang, J.P., Yu, K.L., Wong, A.O., Peter, R.E. 1990.** Differential actions of dopamine receptor subtypes on gonadotropin and growth hormone release in vitro in goldfish. Neuroendocrinology. 51: 664-674.
- **Chang, J. P., Van Goor, F. y Acharya, S. 1991.** Influences of norepinephrine, and adrenergic agonists and antagonists on gonadotropin secretion from dispersed pituitary cells of goldfish, *Carassius auratus*. Neuroendocrinology, 54: 202-210.
- **Chang, J.P., Johnson, J.D., Van Goor, F., Wong, C.J., Yunker, W.K., Uretsky, A.D., Taylor, D., Jobin, R.M., Wong, A.O., Goldberg, J.I. 2000.** Signal transduction mechanisms mediating secretion in goldfish gonadotropes and somatotropes. Biochem. Cell. Biol. 78:139-153
- **Danger, J.M., Breton, B., Vallarino, A., Fournier, G., Pelletier, G., y Vaudry, H., 1991.** Neuropeptide Y in the trout brain and pituitary: localization, characterization, and action on gonadotropin release. Endocrinology, 128: 2360-2368.
- **De Leeuw, R., Habibi, H.R., Nahorniak, C.S., Peter, R.E. 1989.** Dopaminergic regulation of pituitary gonadotropin-releasing hormone receptor activity in the goldfish (*Carassius auratus*). J. Endocrinol.121: 239-247.
- **De Vlaming, V.L., Wiley, H.S., Delahunty, G. y Wallace, R.A., 1980.** Goldfish (*Carassius auratus*) vitellogenin: induction, isolation, properties and relationships to yolk proteins. Comp. Biochem.Physiol., 67B:613-623.
- **Dias, J.A. 1992.** Recent progress in structure-function and molecular analyses of the pituitary/placental glycoprotein hormone receptors. Biochim. Biophys. Acta. 1135: 278-294.
- **Ding, J.L., Hee, P.L., y Lam, T.J., 1989.** Two forms of vitellogenin in the plasma and gonads of male *Oreochromis aureus*. Comp. Biochem. Physiol., 93B: 363-370.
- **Donaldson, E.M., Yamazaki, F., Dye, H.M., y Philleo, W.W. 1972.** Preparation of gonadotropin from salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) pituitary glands.Gen.Comp. Endocrinol. 18, 469-481.
- **Ekström, P., Vanecek, J. 1992.** Localization of 2-[¹²⁵I]iodomelatonin binding sites in the brain of the Atlantic salmon, *Salmo salar* L. Neuroendocrinology. 55: 529-537.
- **Elizur, A., Zmora, N., Rosenfeld, H., Meiri, I., Hassin, S., Gordin, H., Zohar, Y. 1996.** Gonadotropins beta-GtHI and beta-GtHII from the gilthead seabream, *Sparus aurata*. Gen. Comp. Endocrinol. 102:39-46.
- **Evans, R.M. 1988.** The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. Science, 240: 889-895.
- **Farmer, S. W., y Papkoff, H. 1977.** A teleost (*Tilapia mossambica*) gonadotropin that resembles luteinizing hormone. Life Sci. 20: 1227-1232.
- **Fernald RD, White RB. 1999.** Gonadotropin-releasing hormone genes: phylogeny, structure, and functions. Front. Neuroendocrinol. 20:224-240.

- **Fink, G., 1988.** Steroid control of brain and pituitary function. *Quart. J. Exp. Physiol.* 73: 257-293.
- **White RB, Fernald RD. 1998.** Genomic structure and expression sites of three gonadotropin-releasing hormone genes in one species. *Gen. Comp. Endocrinol.* 112: 17-25.
- **Fostier, A., Jalabert, B., Billard, R., Breton, B., y Zohar, Y. 1983.** The gonadal steroidogenesis. *En: Fish Physiology. (Hoar, W.S., Randall, D.J. and Donaldson, E.M. Eds.). Academic Press. New York.* 9A: 277-372.
- **Fuller, P.J., 1991.** The steroid receptor superfamily: mechanism of diversity. *FASEB J.*, 5: 3092-3099.
- **Gaildrat, P., Falcon, J. 2000.** Melatonin receptors in the pituitary of a teleost fish: mRNA expression, 2-[¹²⁵I]iodomelatonin binding and cyclic AMP response. *Neuroendocrinology.*72: 57-66.
- **García-García, A., Muñoz-Cueto, J.A., Rodríguez, R.B., y Sarasquete, M.C., 1994.** Protein G-horseradish peroxidase based method for light-microscope immunocytochemistry. Application to the pituitary gland of the killifish, *Fundulus heteroclitus*. *Eur. J. Histochem.*, 38: 229-236.
- **García-Hernandez, M.P., Koide, Y., Diaz, M.V., Kawachi, H. 1997.** Isolation and characterization of two distinct gonadotropins from the pituitary gland of Mediterranean yellowtail, *Seriola dumerilii* (Risso, 1810). *Gen. Comp. Endocrinol.* 106:389-399.
- **Gilbeau, P.M., Hosobuchi, Y., y Lee, N.M., 1987.** Consequence of dynorphin-A administration on anterior pituitary hormone concentrations in adult male rhesus monkeys. *Neuroendocrinology*, 45: 284-289.
- **Gomez, J.M., Weil, C., Ollitrault, M., Le Bail, P.Y., Breton, B., Le Gac, F. 1999.** Growth hormone (GH) and gonadotropin subunit gene expression and pituitary and plasma changes during spermatogenesis and oogenesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 113: 413-428.
- **González-Martínez, D., Madigou, T., Zmora, N., Anglade, I., Zanuy, S., Zohar, Y., Elizur, A., Muñoz-Cueto, J.A., Kah, O. 2001.** Differential expression of three different prepro-GnRH (Gonadotrophin-releasing hormone) messengers in the brain of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *J. Comp. Neurol.* 429: 144-155.
- **González-Martínez, D., Zmora, N., Mañanos, E., Saligaut, D., Zanuy, S., Zohar, Y., Elizur, A., Kah, O., Muñoz-Cueto, J.A. 2002a.** Immunohistochemical localization of three different prepro-GnRHs (Gonadotrophin-releasing hormones) in the brain and pituitary of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) using antibodies against recombinant GAPs. *J. Comp. Neurol.* 446: 95-113.
- **González-Martínez, D., Zmora, N., Zanuy, S., Sarasquete, C., Elizur, A., Kah, O., Muñoz-Cueto, J.A. 2002b.** Developmental expression of three different prepro-GnRH (Gonadotrophin-releasing hormone) messengers in the brain of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *J. Chem. Neuroanat.* 23: 255-267.
- **Gonzalez-Martinez D, Zmora N, Saligaut D, Zanuy S, Elizur A, Kah O, Munoz-Cueto JA. 2004a.** New insights in developmental origins of different GnRH (gonadotrophin-releasing hormone) systems in perciform fish: an immunohistochemical study in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *J. Chem. Neuroanat.* 28: 1-15.

- **Gonzalez-Martinez D, Madigou T, Mananos E, Cerda-Reverter JM, Zanuy S, Kah O, Munoz-Cueto JA. 2004b.** Cloning and expression of gonadotropin-releasing hormone receptor in the brain and pituitary of the European sea bass: an in situ hybridization study. *Biol. Reprod.* 70:1380-1391.
- **Goos, H.J.Th., 1987.** Steroid feedback on pituitary gonadotropin secretion. *En: Proceedings of the third International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish. St. John's, Newfoundland, Canadá.* pp. 16-20.
- **Goos, H.J.Th., y Murathanoglu, O., 1977.** Localization of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in the forebrain and neurohypophysis of the trout (*Salmo gairdneri*). *Cell. Tiss. Res.* 181: 163-168.
- **Goos, H.J.Th., De Leeuw, R., De Zoeten-Kamp, C., Peute, J., y Blaser, S., 1985.** Gonadotropin-releasing hormone -immunoreactive neuronal structures in the brain and pituitary of the African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell). *Cell Tissue Res.*, 241: 593-596.
- **Gorbman, A., Dickhoff, W.W., Vigna, S.R., Clark, N.B., y Ralph, C.L., 1983.** *Comparative Endocrinology.* Wiley Intersciences, New York.
- **Gothilf, Y., Muñoz-Cueto, J.A., Sagrillo, C.A., Selmanoff, M., Chen, T.T., Elizur, A., Kah, O., y Zohar., Y. 1996.** Three forms of gonadotrophin-releasing hormone in a teleost fish: cDNA characterization and brain localization. *Biol. Reprod.* 55:636-645.
- **Greeley, M. S.Jr., MacGregor, R. I., y Marion, K. R.. 1988.** Variation in plasma oestrogens and androgens during the seasonal and semilunar spawning cycles of female Gulf killifish, *Fundulus grandis* (Baird and Girard). *J. Fish Biol.* 33: 419-429.
- **Guderman, T., Birnbaumer, M, y Birnbaumer, L. 1992.** Evidence for dual coupling of the murine luteinizing hormone receptor to adenylyl cyclase and phosphoinositide breakdown and Ca^{2+} mobilization. *J. Biol. Chem.* 267: 4479-4488.
- **Guraya, S.S., 1986.** The cell and molecular biology of fish oogenesis. *En Monographs in developmental biology.* Vol. 18. H.W. Saver, Karger, Basel. pp.1-223.
- **Habibi, H.R., Peter, R.E. 1991.** Gonadotropin releasing hormone (GnRH) receptors in teleost. *Reproductive Physiology of Fish (A.P. Scott et al., eds), FishSymp 91, Sheffield;* pp:109-113.
- **Habibi, H.R., Patti, D. 1993.** Extrapituitary gonadotropin-releasing hormone (GnRH) binding sites in goldfish. *Fish Physiol. Biochem.* 11:43-49.
- **Halpern-Sebold, L.R., y Schreibman, M.P., 1983.** Ontogeny of centers containing luteinizing hormone-releasing hormone in the brain of platyfish (*Xiphophorus maculatus*) as determined by immunocytochemistry. *Cell. Tiss. Res.* 229: 75-84.
- **Han, Y.S., Liao, I.C., Huang, Y.S., Tzeng, W.N., Yu, J.Y. 2003.** Profiles of PGH-alpha, GTH I-beta, and GTH II-beta mRNA transcript levels at different ovarian stages in the wild female Japanese eel *Anguilla japonica*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 133: 8-16.
- **Hazum, E. y Conn, P.M., 1988.** Molecular mechanism of gonadotropin releasing hormone (GnRH).I. The GnRH receptor. *Endocrine Rev.*, 9: 379-395.
- **Hellqvist, A., Bornestaf, C., Borg, B., Schmitz, M. 2004.** Cloning and sequencing of the FSH-beta and LH beta-subunit in the three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*, and effects of photoperiod and

temperature on LH-beta and FSH-beta mRNA expression. Gen. Comp. Endocrinol. 135:167-174.

- **Heming, M., y Buddington, R.K., 1988.** Yolk absorption in embryonic and larval fishes. En *Fish Physiology*. Vol. XI A. (W.S. Hoar y D.J. Randall, Eds.). Academic Press. New-York. pp. 408-446.

- **Himick, B.A., Golosinski, A.A., Jonsson, A.-C., Peter, R.E. 1993.** CCK/Gastrinlike immunoreactivity in the goldfish pituitary: regulation of pituitary hormone secretion by CCK-like peptides in vitro. Gen. Comp. Endocrinol. 92: 88-103.

- **Holland MCH, Gothlif Y, Meiri I, King JA, Okuzawa K, Elizur A, Zohar Y. 1998.** Levels of the native forms of GnRH in the pituitary of the gilthead seabream, *Sparus aurata*, at several characteristic stages of the gonadal cycle. Gen. Comp. Endocrinol. 112: 394-405.

- **Huckaby, C.S., Conneely, O.M., Beattie, W.G., Dobson, A.D.W., Tsai, M.J. y O'Malley, B.W. 1987.** Structure of the chromosomal chicken progesterone receptor gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 8380-8384.

- **Hunzicker-Dunn, M., y Birnbaumer, L. 1976.** Adenylyl cyclase activities in ovarian tissues. II. Regulation of responsiveness to LH, FSH, and PGE1 in the rabbit. Endocrinology, 99: 185-197.

- **Idler, D.R., Bazar, L.S., and Hwang, S.J. 1975.** Fish gonadotropin(s). III. Evidence for more than one gonadotropin in chum salmon pituitary glands. Endocrine Res. Commun. 2, 237-249.

- **Iigo, M., Kobayashi, M., Ohtani-Kaneko, R., Hara, M., Hattori, A., Suzuki, T., Aida, K. 1994.** Characteristics, day-night changes, subcellular distribution and localization of melatonin binding sites in the goldfish brain. Brain Res. 644: 213-220.

- **Itoh, H., Suzuki, K., y Kawauchi, H., 1988.** The complete amino acid sequences of β -subunits of two distinct chum salmon GTHs. Gen. Comp. Endocrinol., 71: 438-451.

- **Itoh, H., Suzuki, K., y Kawauchi, H., 1990.** The complete amino acid sequences of α -subunits of chum salmon gonadotropins. Gen. Comp. Endocrinol., 78: 56-65.

- **Iwakoshi, E. Takuwa-Kuroda, K. Fujisawa, Y. Hisada, M. Ukena, K. Tsutsui K., Minakata, H. 2002.** Isolation and characterization of a GnRH-like peptide from *Octopus vulgaris*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 291: 1187-1193.

- **Jimenez-Liñán, M., Rubin, B.S., King, J.C. 1997.** Examination of guinea pig luteinizing hormone-releasing hormone gene reveals a unique decapeptide and existence of two transcripts in the brain. Endocrinology; 138(10):4123-30.

- **Johnston, S.A., y Maler, L., 1992.** Anatomical organization of the hypophysiotropic systems in the electric fish, *Apteronotus leptorhynchus*. J. Comp. Neurol. 317: 421-437.

- **Kadmon, G., Yaron, Z., y Gordin, H., 1985.** Sequence of gonadal events and estradiol levels in *Sparus aurata* (L.) under two photoperiod regimes. J. Fish Biol. 26: 609-620.

- **Kagawa, H., Young, G. y Nagahama, Y. 1984.** In vitro estradiol-17 β and testosterone production by ovarian follicles of the goldfish, *Carassius auratus*. Gen. Comp. Endocrinol. 54:139-143.

- **Kajimura, S., Yoshiura, Y., Suzuki, M., Aida, K. 2001.** cDNA cloning of two gonadotropin beta subunits (GTH-Ibeta and -IIbeta) and their expression

profiles during gametogenesis in the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). Gen. Comp. Endocrinol. 122:117-129.

- **Kah, O., Peter, R.E., Dubourg, P., Cook, H., 1983.** Effects of monosodium L-glutamate on pituitary innervation in goldfish, *Carassius auratus*. Gen. Comp. Endocrinol., 51: 338-346.

- **Kah, O., Breton, B., Dulka, J. G., Nuñez-Rodríguez, J., Peter, R.E., Corigan, A., Rivier, J. J., Vale, W. W. 1986.** A reinvestigation of the Gn-RH (Gonadotropin-releasing hormone) systems in the goldfish brain using antibodies to salmon Gn-RH. Cell. Tissue Res. 244: 327-337.

- **Kah, O., Dulka, J.G., Dubourg, P., Thibault, J. y Peter, R.E. 1987.** Neuroanatomical substrate for the inhibition of gonadotropin secretion in goldfish: existence of a dopaminergic preoptico-hypophyseal pathway. Neuroendocrinology, 45:451-458.

- **Kah, O., Danger, J.M., Dubourg, P., Pelletier, G., Vaudry, H., y Calas, A., 1989.** Characterization, cerebral distribution and gonadotropin-release activity of neuropeptide Y (NPY) in the goldfish. Fish Physiol. Biochem., 7: 69-76.

- **Kah, O., Zanuy, S., Mañanos, E., Anglade, I, Carrillo, M. 1991.** Distribution of salmon gonadotrophin-releasing hormone in the brain and pituitary of the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Cell Tissue Res. 266: 129-136.

- **Kah, O., Trudeau, V.L., Sloley, B.D., Duborg, P., Chang, J.P., Yu, K.L., y Peter, R.E., 1992.** Involvement of GABA in the neuroendocrine regulation of gonadotrophin release in the goldfish. Neuroendocrinology, 55: 396-404.

- **Kah, O., Anglade, I., Leprêtre, E., Dubourg, P., y de Monbrison, D. 1993.** The reproductive brain in fish. Fish Physiol. Biochem., 11:85-98.

- **Kaiser, U.B., Jakubowiak, A., Steinberger, A., Chin, W.W. 1993.** Regulation of rat pituitary gonadotropin-releasing hormone receptor mRNA levels in vivo and in vitro. Endocrinology 133:931-934.

- **Kakar, S.S., Musgrove, L.C., Devor, D.C., Sellers, J.C., Neill, J.D. 1992.** Cloning, sequencing, and expression of human gonadotropin releasing hormone (GnRH) receptor. Biochem. Biophys. Res. Commun. 189:289-295.

- **Kanamori, A., y Nagahama, Y. 1988.** Developmental changes in the properties of gonadotropin receptors in the ovarian follicles of amago salmon (*Onchorhynchus rhodurus*) during oogenesis. Gen. and comp. Endocrinol. 72: 25-38.

- **Kanamori, A., Adachi, S. y Nagahama, Y. 1988.** Developmental changes in steroidogenic responded of ovarian follicles of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*) to chum salmon gonadotropin during oogenesis. Gen. Comp. Endocrinol. 72: 13-24.

- **Kawauchi, H., Tubokawa, M., Kanezawa, A., y Kitigawa, H., 1980.** Occurrence of two different endorphins in the salmon pituitary. Biochem. Biophys. Res. Comm., 92: 1278-1288.

- **Kawauchi, H., Suzuki, K., Itoh, H., Swanson, P., Naito, N., Nagahama, Y., Nozaki, M., 1989.** The duality of teleost gonadotropins. Fish Physiol. Biochem., 7: 29-38.

- **Kawauchi, H., Itoh, H., y Koide, Y. 1991.** Additional evidence for duality of fish gonadotropins. En: Proc. 4th Int. Symp. Reprod. Physiol. Fish (Scott, A.P., Sumpter, J.P., Kime, D.E. & Rolfe, M.S. Eds.). Univ, of East Anglia, Norwich, U.K. pp. 19- 21.

- **Khakoo Z, Bhatia A, Gedamu L, Habibi HR. 1994.** Functional specificity for salmon gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and chicken GnRH-II coupled

to the gonadotropin release and subunit messenger ribonucleic acid level in the goldfish pituitary. *Endocrinology* 134: 838-847.

- **Khan, I.A., y Thomas, P., 1991.** Stimulatory effects of serotonin on gonadotropin release in the Atlantic croaker. *En Proc. 4th. Int. Symp. on Reproductive Physiology of Fish.* Scott, A.P., Sumpter, J.P., Kime, D.E., y Rolfe, M.S., Eds. Univ. East Anglia Printing Unit. Sheffield. UK. pp: 62.

- **Khan, I.A., Thomas, P. 1996.** Melatonin influences gonadotropin II secretion in the Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 104: 231-242

- **Kim, Y.S., Stumpf, W.E. y Sar, M. 1978.** Topography of estrogen target cells in the forebrain of goldfish, *Carassius auratus*. *J. Comp. Neurol.* 182: 611-620.

- **Kime, D.E., Scott, A.P., y Canario, A.V.M., 1992.** In vitro biosynthesis of steroids, including 11-deoxycortisol and 5 α -pregnane-3 β ,7 α ,17,20 β -tetrol, by ovaries of the goldfish *Carassius auratus* during the stage of oocyte final maturation. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 87: 375-384.

- **King, J.A., Millar, R.P. 1982a.** Structure of chicken hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone I. Structural determination on partially purified material. *J. Biol. Chem.* 257: 10722-10728.

- **King, J.A., Millar, R.P. 1982b.** Structure of chicken hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone II. Isolation and characterization. *J. Biol. Chem.* 257:10729-10732.

- **King, J.A., Dufour, S., Fontaine, Y.A., Millar, R.P. 1990.** Chromatographic and immunological evidence for mammalian GnRH and chicken GnRH II in eel (*Anguilla anguilla*) brain and pituitary. *Peptides.* 11: 507-514.

- **King, J.A., y Millard, R.P., 1992.** Evolution of gonadotropin-releasing hormones. *TEM* 3: 339-346.

- **Kishida, M., y Specker, J.L., 1993.** Vitellogenin in tilapia (*Oreochromis mossambicus*): induction of two forms by estradiol, quantification in plasma and characterization in oocyte extract. *Fish Physiol. Biochem.* 12: 171-182.

- **Kishida, M., Anderson, T.R., y Specker, J.L., 1992.** Induction by estradiol of vitellogenin in striped bass (*Morone saxatilis*): Characterization and quantification in plasma and mucus. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 88: 29-39.

- Klausen, C., Chang, J.P., and Habibi, H.R. 2002. Multiplicity of gonadotropin-releasing hormone signaling: a comparative perspective. *Prog. Brain Res.* 141, 111-128.

- **Klungland, H., Andersen, O., Kisen, G., Aleström, P., y Tora, L., 1993.** Estrogen receptor binds to the salmon GnRH gene in a region with long palindromic sequences. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 95: 147-154.

- **Kobata, A., 1992.** Structures and functions of the sugar chains of glycoproteins. *Eur. J. Biochem.*, 209: 483-501.

- **Kobayashi, M., y Stacey, N.E., 1990.** Effect of ovariectomy and steroid hormone and steroid hormone implantation on serum gonadotropin levels in female goldfish. *Zool. Sci.* 7: 715-721.

- **Koide, Y., H. Itoh, and H. Kawachi. 1993.** Isolation and characterization of two distinct gonadotropins, GTHI and GTHII, from bonito (*Katsuwonus plelamis*) pituitary glands. *Int. J. Peptide Prot. Res.* 41: 52-65.

- **Korsgaard, B., y Mommsen, T.P., 1993.** Gluconeogenesis in hepatocytes of immature rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): control by estradiol. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 89: 17-27.

- Kuiper, G.G.J.M., Faber, P.W., Van Rooij, H.C.J., Van der Korput, J.A.G.M., Ris-Stalpers, C., Klaassen, P., Trapman, J y Brinkmann, A.O. 1989. Structural organization of the human androgen gene. *J. Mol. Endocrinol.* 2:R1-R4.
- Kumar, R.S., Trant, J.M. 2001. Piscine glycoprotein hormone (gonadotropin and thyrotropin) receptors: a review of recent developments. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 129: 347-355.
- Leadem, C.A., Crowley, W.R., Simpkins, J.W., y Kalra, S.P., 1985. Effects of naloxone on catecholamine and LHRH release from the perfused hypothalamus of the steroid-primed rats. *Neuroendocrinology*, 40: 497-500.
- Le Gac, F, y Fostier, A., 1987. Evolution of sensitivity to GTH and GTH receptors in the trout testis (*Salmo gairdneri*). En: *Proceedings 3rd International Symposium on Reproductive Physiology of Fish. St. John's. Canada.* pp. 73.
- Le Gac, F., Breton, B., y Bougoussa, M. 1988. Gonadotropic hormone (GTH) receptors in the testis of the trout, *Salmo gairdneri*: *in vitro* studies. *Fish Physiol. Biochem.* 5(4): 209-217.
- Lethimonier, C., Madigou, T., Muñoz-Cueto, J.A., Lareyre, J.J., Kah, O. 2004. Evolutionary aspects of GnRHs, GnRH neuronal systems and GnRH receptors in teleost fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 135: 1-16.
- Le Roux, M.G., Thèzè, N., Wolff, J., y Le Pennec, J.P., 1992. Organization of a rainbow trout estrogen receptor gene. *Biochim. et Biophys. Acta*, 1172: 226-230.
- Lin, X-W.P., Petrino, T.R., y Wallace, R.A., 1991. A non-salmonid model for the study of fish reproduction. En *Proc. of the Fourth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish. FishSymp, 91. Sheffield.* pp.74-76.
- Lin, X-W.P., Rupnow, B.A., Price, D.A., Greenberg, R.M., y Wallace, R.A., 1992. *Fundulus heteroclitus* gonadotropins. Cloning of gonadotropic hormone (GTH) I and II β subunits using the polimerase chain reaction. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 85: 127-139.
- Lohse, M.J. 1993. Molecular mechanisms of membrane receptor desensitization. *Biochim. Biophys. Acta.* 1179: 171-188.
- Lovejoy, D.A., Fischer, W.H., Ngamvongchon, S., Craig, A.G., Nahorniak, C.S., Peter, R.E., Rivier, J.E., Sherwood, N.M. 1992. Distinct sequence of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in dogfish brain provides insight into GnRH evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 6373-6377.
- Madigou, T., Mañanos-Sanchez, E., Hulshof, S., Anglade, I., Zanuy, S., Kah, O., 2001. Cloning, tissue distribution, and central expression of the gonadotropin-releasing hormone receptor in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biol. Reprod.* 63, 1857-1866.
- Mañanos, E.L., Anglade, I., Chyb, J., Saligaut, C., Breton, B., Kah, O. 1999. Involvement of gamma-aminobutyric acid in the control of GTH-1 and GTH-2 secretion in male and female rainbow trout. *Neuroendocrinology* 69:269-280.
- Marian, J., Cooper, R.L, Conn, P.M. 1981. Regulation of the rat pituitary releasing-hormone receptor. *Mol. Pharmacol.* 19: 399-405.
- Marshall, J.C., Shakespear, R.A., Odell, W.D. 1976. LHRH-pituitary plasma membrane binding: the presence of specific binding sites in other tissues. *Clin. Endocrinol.* 5: 671-677.

- **Martinoli, M.G., Dubourg, P., Geffard, M., Calas, A. Kah, O. 1990.** Distribution of GABA-immunoreactive neurones in the forebrain of the goldfish. *Cell Tissue Res.* 260: 77–84.
- **Mateos, J., Mañanos, E., Martinez-Rodriguez, G., Carrillo, M., Querat, B., Zanuy, S. 2003.** Molecular characterization of sea bass gonadotropin subunits (alpha, FSHbeta, and LHbeta) and their expression during the reproductive cycle. *Gen. Comp. Endocrinol.* 133: 216-232.
- **Matsuo, H., Baba, Y., Nair, R.M.G., Arimura, A., y Schally, A.V., 1971.** Structure of the porcine LH- and FSH-releasing hormone. I. The proposed amino acid sequence. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 43: 1334-1339.
- **Matsuyama, M., Adachi, S., Nagahama, Y., Maruyama, K., Matsuura, S., 1988.** Diurnal rhythm of oocyte development and plasma steroid hormone levels in the red sea bream, *Pagrus major*, during the spawning season. *Aquaculture*, 73: 357-372.
- **Matsuyama, M., Adachi, S., Nagahama, Y., Kitajima, C., y Matsuura, S. 1991.** Annual reproductive cycle of the captive female Japanese sardine *Sardinops melanostictus*: relationship to ovarian development and serum levels of gonadal steroid hormones. *Mar. Biol.* 108: 21-29.
- **Mazurais, D., Brierley, I., Anglade, I., Drew, J., Randall, C., Bromage, N., Michel, D., Kah, O., Williams, L.M. 1999.** Central melatonin receptors in the rainbow trout: comparative distribution of ligand binding and gene expression. *J. Comp. Neurol.* 409: 313-324.
- **Mayer, I., Berglund, I., Rydevik, M., Borg, B., y Schulz, R., 1990.** Plasma levels of five androgens and 17 α -OH-20 β -dihydroxyprogesterone in immature and mature male Baltic salmon (*Salmo salar*) parr, and the effects of castration and androgen replacement in mature parr. *Can. J. Zool.*, 68: 263-267.
- **McFarland, K. C., Sprengel, R. Phillips, H. S. R., Köhler, M., Roseblit, N., Nikolics, K., Segaloff, D. L., y Seeburg, P. H. 1989.** Lutropin-choriogonadotropin receptor; an unusual member of the G protein coupled receptor family. *Science* 245: 494-499.
- **Minegishi, T., Nakamura, K., Takakura, Y., Miyamoto, K., Hasegawa, Y., Ibuki, Y., y Igarashi, M. 1990.** Cloning and sequencing of human LH/hCG receptor cDNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 172: 1049-1054.
- **Miyamoto, K., Hasegawa, I., Nomura, M., Igarashi, M., Kangawa, K., Matsuo, H. 1984.** Identification of the second gonadotropin-releasing hormone in chicken hypothalamus: Evidence that gonadotropin secretion is probably controlled by two distinct gonadotropin-releasing hormones in avian species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 3874-3878.
- **Mommsen, T.P., French, C.J., y Hochachka, P.W., 1980.** Sites and patterns of protein and amino acid utilization during spawning migration of salmon. *Can. J. Zool.*, 58: 1785-1799.
- **Montaner AD, Somoza GM, King JA, Bianchini JJ, Bolis CG, Affanni JM. 1998.** Chromatographic and immunological identification of GnRH (gonadotropin-releasing hormone) variants. Occurrence of mammalian and a salmon-like GnRH in the forebrain of an eutherian mammal: *Hydrochaeris hydrochaeris* (Mammalia, Rodentia). *Regul. Pept.* 73:197-204.
- **Montaner, A.D., Park, M.K., Fischer, W.H., Craig, A.G., Chang, J.P., Somoza, G.M., Rivier J.E., Sherwood, N.M. 2001.** Primary structure of a novel

gonadotropin-releasing hormone in the brain of a teleost, Pejerrey. *Endocrinology* 142:1453–1460.

- **Nagahama, Y. 1983.** The functional morphology of teleost gonads. Parte A: Endocrine Tissues and Hormones. *En: Fish Physiology. (Hoar, W.S., Randall, D.J. and Donaldson, E.M., Eds.). Academic Press IV: 223-275.*

- **Nagahama, Y., 1987.** Endocrine control of oocyte maturation. *En Hormones and Reproduction in Fishes, Amphibians and Reptiles. (Norris, D.O. y Jones, R.E., Eds.). Plenum Press, New York, pp. 171-202.*

- **Nagahama, Y., 1994.** Endocrine regulation of gametogenesis in fish. *Int. J. Dev. Biol.*, 38: 217-229.

- **Nagahama, Y., Hirose, K., Young, G., Adachi, S., Suzuki, K. y Tamaoki, B. 1983.** Relative *in vitro* effectiveness of 17α , 20β dihidroxi-4-pregnen-3-one and other pregnene derivatives on germinal vesicle breakdown in oocytes of ayu (*Plecoglossus altivelis*), amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*), rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and goldfish (*Carassius auratus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 51: 15-23.

- **Nagahama, Y., Matsuhisa, A., Iwamatsu, T., Sakai, N., y Fukada, S. 1991.** A mechanism for the action of pregnant mare serum gonadotropin on aromatase activity in the ovarian follicle of the medaka, *Oryzias latipes*. *J. Exp. Zool.* 259:53-58.

- **Ngamvongchon, S., Lovejoy, D.A., Fischer, W.H., Craig, A.G., Nahorniak, C.S., Sherwood, N.M. 1992.** Primary structure of two forms of gonadotropin-releasing hormone, one distinct and one conserved, from catfish brain. *Mol. Cell. Neurosci.* 3: 17-22.

- **Naito, N., Hyodo, S., Okumoto, N., Urano, A., y Nakai, Y., 1991.** Differential production and regulation of gonadotropins (GTH I and GTH II) in the pituitary gland of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, during ovarian development. *Cell. Tiss. Res.* 266: 457-467.

- **Naito, N., Suzuki, K., Nozaki, M., Swanson, P., Kawauchi, H., y Nakai, Y. 1993** Ultrastructural characteristics of two distinct gonadotropes (GTH I- and GTH II-cells) in the pituitary of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Physiol. Biochem.* 11: 241-246.

- **Ng, T. B., e Idler, D. R. 1978a** "Big" and "little" forms of plaice vitellogenic and maturational hormones. *Gen. Comp. Endocrinol.* 34: 408-420.

- **Ng, T. B., e Idler, D. R. 1978b.** A vitellogenic hormone with a large and small form from salmon pituitaries. *Gen. Comp. Endocrinol.* 35: 189-195.

- **Ng, T.B., e Idler, D.R. 1979.** Studies of two types of gonadotropins from both american plaice and winter flounder pituitaries. *Gen. Comp. Endocrinol.* 38: 410-420.

- **Ng, T.B., Woo, N.Y.A., Tam, P.P.L., y Au, C.Y.W., 1984.** Changes in metabolism and hepatic ultrastructure induced by estradiol and testosterone in immature female *Epinephelus akaara* (Teleostei, Serranidae). *Cell Tiss. Res.*, 236: 651-659.

- **Norberg, B., y Haux, C., 1985.** Induction, isolation and a characterization of the lipid content of plasma vitellogenin from two species: Rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and sea trout (*Salmo trutta*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 81B: 869-876.

- **Nozaki, M., N. Naito, P. Swanson, K. Miyata, Y. Nakai, Y. Oota, K. Suzuki, and H. Kawauchi. 1990a.** Salmonid pituitary gonadotrophs: I. Distinct cellular distributions of two gonadotropins GTH I and GTH II. *Gen. Comp. Endocrinol.* 77: 348- 357.

- **Nozaki, M., Swanson, P., Dickhoff, W. W., Nakai, Y., Suzuki, K. y Kawauchi, H. 1990b.** Salmonid pituitary gonadotrophs: II. Ontogeny of GTH I and GTH II cells in the rainbow trout (*Salmo gairdneri irideus*). Gen. Comp. Endocrinol., 77:358-367.
- **Oba, Y., Hirai, T., Yoshiura, Y., Kobayashi, T., Nagahama, Y. 2001.** Fish gonadotropin and thyrotropin receptors: the evolution of glycoprotein hormone receptors in vertebrates. Comp. Biochem. Physiol. B 129: 441-448.
- **Okada, T., Kawazoe, I., Kimura, S., Sasamoto, Y., Aida, K., y Kawauchi, H., 1994.** Purification and characterization of gonadotropin I and II from pituitary glands of tuna (*Thunnus obesus*). Int. J. Peptide Prot. Res. 43: 69-80.
- **Okubo, K., Amano, M., Yoshiura, Y., Suetake, H., Aida, K. 2000.** A novel form of gonadotropin-releasing hormone in the medaka, *Oryzias latipes*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 276: 298-303.
- **Okubo, K., Sakai, F., Lau, E., Aida, K., Nagahama, Y. 2004.** **Characterization** of embryonic development of forebrain gonadotrophin-releasing hormone neurons using transgenic medaka. 5th International Symposium on Fish Endocrinology. Castellón, September 2004. O5.
- **Okuzawa, K., Granneman, J., Bogerd, J., Goos, H.J.Th., Zohar, Y. y Kagawa, H.** Distinct expression of GnRH genes in the red seabream brain. En *3rd International Symposium on Fish Endocrinology*. Hakodate, pp. 59.
- **Olivereau, M. 1978.** Les cellules gonadotropes chez les salmonides. Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys. 18: 793-798.
- **Olivereau, M. y Nagahama, Y. 1983.** Immunocytochemistry of gonadotrophic cells in the pituitary of some teleost species. Gen. Comp. Endocrinol. 50: 252-260.
- **O'Malley, B.W., Roop, D.R., Lai, E.C., Nordstrom, J.L., Catterall, J.F., Swaneck, G.E., Colbert, D.A., Tsai, M.J., Dugaiczky, A., y Wood, S.C.L., 1979.** The ovalbumin gene: organization, structure, transcription and regulation. Rec. Prog. Horm. Res. 35: 1-46.
- **Onitake, K., y Iwamatsu, T. 1986.** Immunocytochemical demonstration of steroid hormones in the granulosa cells of the medaka, *Oryzias latipes*. J. Exp. Zool. 239: 97-103.
- **Oppen-Bernsten, D.O., Gram-Jensen, E., y Walther, B.T., 1992.** Zona radiata proteins are synthesized by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes in response to oestradiol-17 β . J. Endocrinol., 135: 293-302.
- **Otsuka, S. 1956.** On the extraction and bioassay of the follicle stimulating and luteinizing substances of the salmon. Endocrinol. Japon. 3: 272-277.
- **Ouchi, K., Adachi, S., y Nagahama, Y., 1988a.** Changes in plasma levels of steroid during sexual maturation of female red seabream *Pagrus major*. Nippon Suisan Gakkaishi, 54(4): 585-591.
- **Ouchi, K., Adachi, S., y Nagahama, Y., 1988b.** Changes in plasma levels of steroid hormones during sexual maturation of male red seabream *Pagrus major*. Nippon Suisan Gakkaishi 54(4), 593-597.
- **Pakdel, F., Le Gellec, C., Vaillant, C., Leroux, M.G. y Valotaire, Y. 1989.** Identification and estrogen induction of two estrogen receptors (ER)messenger ribonucleic acids in the rainbow trout liver: sequence homology with other ERs. Mol. Endocrinol. 3: 44-51
- **Pakdel, F., LeGac, F., LeGoff, P., y Valotaire, Y., 1990.** Full length sequence and *in vitro* expression of a rainbow trout estrogen receptor cDNA. Mol. Cell. Endocrinol. 71: 195-204.

- Pakdel, F., Feon, S., Le Gac, F., Le Menn, F. and Valotaire, Y. 1991. *In vitro* estrogen induction of hepatic estrogen receptor mRNA and correlation with vitellogenin mRNA in rainbow trout. *Mol. Cell. Endocrinol.* 75:205-212.
- Pandolfi, M., Muñoz-Cueto, J.A., Lo Nostro, F.L., Downs, J.L., Paz, D.A. Maggese, M.C., Urbanski, H.F. **En prensa.** The GnRH systems of *Cichlasoma dimerus* revisited: A localization study using antibodies and riboprobes to GnRH associated peptides. *Cell Tissue Res.*
- Pankhurst, N.W., y Carragher, J.F., 1991. Seasonal endocrine cycles in marine teleosts. En: *Proc. of the Fourth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish. University of East Anglia, Norwich, U.K., Scott, A.P., Sumpter, J.P., Kime, D.E., y Rolfe, M.S. FishSymp 91, Sheffield.* pp. 131-135.
- Pankhurst, N.W., y Barnett, C.W., 1993. Relationship of population density, territorial interaction and plasma levels of gonadal steroids in spawning male demoiselles *Chromis dispilus* (Pisces: Pomacentridae). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 90: 168-176.
- Parhar IS. 1997. GnRH in tilapia: three genes, three origins and their roles. In: Parhar IS, Sakuma Y, editors. *GnRH Neurons: Gene to Behavior.* Tokyo: Brain Shuppan. Chapter 5, p 99-122.
- Pasqualini, C., Vidal, B., Le Belle, N., Sbaihi, M., Weltzien, F.A., Vernier, P., Zohar, Y., Dufour, S. 2004. An antagonist to GnRH in the control of reproduction in teleost fish: dopaminergic inhibition. Ancestral origin and differential conservation within vertebrates? *J. Soc. Biol.*198:61-67.
- Peng, C., Humphries, S., Peter, R.E., Rivier, J.E., Blomqvist, A.G., y Larhammar, D., 1993. Actions of goldfish neuropeptide Y on the secretion of Growth Hormone and Gonadotropin-II in female goldfish. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 90: 306-317.
- Peng, C., Gallin, W, Peter, R.E., Blomqvist, G y Larhammar, D. 1994. Neuropeptide Y gene expression in the goldfish brain: Distribution and regulation by ovarian steroids. *Endocrinology*, 134: 1095-1103.
- Pert, C.B., Aposhian, D., y Snyder, S.H., 1974. Phylogenetic distribution of opiate receptor binding. *Brain. Res.*, 75: 356-361.
- Peter, R.E., Paulencu, C. 1990. Involvement of the preoptic region in gonadotropin release-inhibition in goldfish, *Carassius auratus*. *Neuroendocrinology* 31(2):133-141.
- Peter R.E., Trudeau, V.L., Sloley, B.D., Peng, C., y Nahorniak, C.S., 1991. Actions of the catecholamines, peptides and sex steroids in regulation of gonadotropin-II in the goldfish. En *Proc. of the Fourth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish. Scott, A.P., Sumpter, J.P., Kime, D.E., y Rolfe, M.S., Eds., University of East Anglia. Norwich, U.K., FishSymp 91. Sheffield.* pp 30-33.
- Petersen, I.M., Sand, O., y Korsgaard, B., 1983. A time course study of the effect of repetitive doses of estradiol-17 β on serum glucose and lipids, liver glycogen and some carbohydrate metabolizing enzymes in liver of male flounder (*Platichthys flesus*). *Comp. Biochem. Physiol.*, B 74: 459-466.
- Petrino, T. R., Greely, M. S. J., Selman, K., Lin, Y. W. P. y Wallace, R. A. 1989a. Steroidogenesis in *Fundulus heteroclitus* I. Production of 17 α -hidroxy,20 β -dihydroprogesterone, testosterone and 17 β -estradiol by prematuration follicles *in vitro*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 73: 147-156.

- **Petrino, T. R., Greely, M. S. J., Selman, K., Lin, Y. W. P. y Wallace, R. A. 1989b.** Steroidogenesis in *Fundulus heteroclitus*: II. Production of 17 α -OH-, 20 β -DHP, T and E₂ by various components of the ovarian follicle. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 76: 230-240.
- **Petrino, T.R., Lin, Y-W.P., y Wallace, R.A., 1991.** Effects of phorbol ester on ovarian steroid production and oocyte maturation in *Fundulus heteroclitus*. En:*Proc. of Fourth Int. Symposium on Reproductive Physiology of Fish. Univ. East Anglia. Norwich. U.K., Scott, A.P., Sumpter, J.P., Kime, D.E., y Rolfe, M.S., Eds. FishSymp 91. Sheffield. pp.102.*
- **Petrino, T.R., Lin, Y-W.P., Netherton, J.C., Powell, D.H., y Wallace, R.A., 1993.** Steroidogenesis in *Fundulus heteroclitus* V: Purification, characterization, and metabolism of 17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one by intact follicles and its role in oocyte maturation. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 92: 1-15.
- **Peute, J., Goos, H. J. T., De Bruyn, M. G. A. y Van Oordt, P. G. W. 1978.** Gonadotropic cells of the rainbow trout pituitary during the annual cycle. Ultrastructure and hormone content. *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.* 18: 905-910.
- **Pierce, J. G., y Parsons, T. F 1981.** Glycoprotein hormones:structure and function. *Ann. Rev. Biochem.* 50: 465- 495.
- **Planas, J.V., Swanson, P., y Dickhoff, W.W., 1993.** Regulation of testicular steroid production in vitro by gonadotropins (GTH I and GTH II) and cyclic AMP in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 91: 8-24.
- **Ponglikitmongkol, M., Green, S., y Chambon, P., 1988.** Genomic organization of the human estrogen receptor. *EMBO J.*, 7:3385-3388.
- **Pontet, A., Danger, J.M., Dubourg, P., Pelletier, G., Vaudry, H., Calas, A., y Kah, O., 1989.** Characterization and distribution of neuropeptide Y in the brain of the goldfish. *Cell. Tiss. Res.* 255: 529-538.
- **Powell, J.F.F., Zohar, Y., Elizur, A., Park, M., Fischer, W.H., Craig, A.G., Rivier, J.E., Lovejoy, D.A., y Sherwood, N.M., 1994.** Three forms of gonadotropin-releasing hormone characterized from brains of one species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 91:12081-12085.
- **Powell JF, Krueckl SL, Collins PM, Sherwood NM. 1996a.** Molecular forms of GnRH in three model fishes: rockfish, medaka and zebrafish. *J. Endocrinol.* 150:17-23.
- **Powell, J.F.F., Reska-Skinner, S., Prakash, M.O., Fisher, W.H., Park, M., Rivier, J.E., Craig, A.G., Mackie, G.O., Sherwood, N.M. 1996b.** Two new forms of gonadotropin-releasing hormone in a protochordate and the evolutionary implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 10461-10464.
- **Powell JF, Standen EM, Carolsfeld J, Borella MI, Gazola R, Fischer WH, Park M, Craig AG, Warby CM, Rivier JE, Val-Sella MV, Sherwood NM. 1997.** Primary structure of three forms of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) from the pacu brain. *Regul. Pept.* 68:189-195.
- **Power, R.F., Conneely, O.M., y O'Malley, B.W., 1992.** New insights into activation of the steroid hormone receptor superfamily. *TIBS*, 13: 318-323.
- **Prat, F., Zanuy, S., Carrillo, M., De Mones, A., y Fostier, A., 1990.** Seasonal changes in levels of gonadal steroids of sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 78: 361-373.
- **Querat B, Sellouk A, y Salmon C. 2000.** Phylogenetic analysis of the vertebrate glycoprotein hormone family including new sequences of sturgeon

(*Acipenser baeri*) beta subunits of the two gonadotropins and the thyroid-stimulating hormone. *Biol Reprod.* 63: 222-228.

- **Quesada, J., Lozano, M. T., Ortega, A. y Agulleiro, B. 1988.** Immunocytochemical and ultrastructural characterization of the cell types in the adenohypophysis of *Sparus aurata* L. (Teleost). *Gen. Comp. Endocrinol.* 72: 209-225.

- **Quesnel, H., y Breton, B. 1993.** Solubilization and purification of the gonadotropin (GTH II) receptor from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) ovaries. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 91: 272-280.

- **Rand-Weaver, M., Swanson, P., Kawachi, H., y Dickhoff, W.W., 1992.** Somatolactin, a novel pituitary protein: purification and plasma levels during reproductive maturation of coho salmon. *J. Endocrinol.*, 133: 393-403.

- **Rinchard, J., Kestemont, P., Kühn, E.R., y Fostier, A., 1993.** Seasonal changes in plasma levels of steroid hormones in an asynchronous fish the Gudgeon *Gobio gobio* L. (Teleostei, Cyprinidae). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 92: 168-178.

- **Robertson, O. H., y Rinfret, A. P. 1957.** Maturation of the infantile testis in rainbow trout produced by salmon pituitary gonadotropins administered in cholesterol pellets. *Endocrinology* 60: 559-562.

- **Rodríguez L, Carrillo M, Sorbera LA, Soubrier MA, Mañanós E, Holland MC, Zohar Y, Zanuy S. 2000.** Pituitary levels of three forms of GnRH in the male European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) during sex differentiation and first spawning season. *Gen. Comp. Endocrinol.* 120: 67-74.

- **Rodríguez-Gómez FJ, Rendón MC, Sarasquete C, Muñoz-Cueto JA. 1999.** Distribution of gonadotropin-releasing hormone immunoreactive systems in the brain of the Senegalese sole, *Solea senegalensis*. *Histochem. J.* 31: 695-703.

- **Rodríguez-Gomez, F.J., Rendon-Unceta, C., Sarasquete, C., Muñoz-Cueto, J.A. 2001.** Distribution of neuropeptide Y-like immunoreactivity in the brain of the Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Anat. Rec.* 262: 227-237.

- **Roess, D.A., Rahman, N.A., Kenny, N., y Barisas, B.G. 1992.** Molecular dynamics of luteinizing hormone receptors on rat luteal cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1137: 309-316.

- **Rosemlun, P.M., y Callard, I.P., 1988.** The endogenous opioid peptide system in male brown bullhead catfish, *Ictalurus nebulosus* Lesueur: characterization of naloxone binding and the response to naloxone binding during the annual reproductive cycle. *J. Exp. Zool.*, 245: 244-255.

- **Rosemlun, P.M., y Peter, R.E., 1989.** Evidence for the involvement of endogenous opioids in the regulation of gonadotropin secretion in male goldfish, *Carassius auratus*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 73: 21-27.

- **Saga, T., Oota, Y., Nozaki, M., y Swanson, P., 1993.** Salmonid pituitary gonadotrophs. III. Chronological appearance of GTH I and other adenohypophysial hormones in the pituitary of developing rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss irideus*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 92: 233-241.

- **Salbert, G., Bonnec, G., LeGoff, P., Baoujard, D., Valotaire, Y., y Jego, P., 1991.** Localization of estradiol mRNA in the forebrain of the rainbow trout. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 78: 173-180.

- **Salbert, G., Atteke, C., Bonnec, G., y Jego, P., 1993.** Differential regulation of the estrogen receptor mRNA by estradiol in the trout hypothalamus and pituitary. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 96: 177-182.

- **Salesse, R., Remy, J.J., Levin, J.M., Jallal, B., y Garnier, J. 1991.** Towards understanding the glycoprotein hormone receptors. *Biochimie*, 73: 109-120.
- **Saligaut, C., Salbert, G., Bailhache, T., Bennani, S., y Jego, P., 1992.** Serotonin and dopamine turnover in the female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) brain and pituitary: changes during the annual reproductive cycle. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 85: 261-268.
- **Salmon, C., Marchelidon, J., Fontaine-Bertrand, E., y Fontaine, Y.A. 1985.** Human chorionic gonadotrophin and immature fish ovary: characterization and mechanism of the *in vitro* stimulation of cyclic adenosine monophosphate accumulation. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 58: 101-108.
- **Scott, A.P., MacEnzie, D.S., y Stacey, N.E., 1984.** Endocrine changes during natural spawning in the white sucker, *Catostomus commersoni*. II Steroid hormones. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 56: 349-359.
- **Schally, A.V., Arimura, A., Baba, Y., Nair, R.M.G., Matsuo, H., Redding, T.W. and Debeljuk, L., 1971.** Isolation and properties of the FSH and LH-releasing hormone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 43: 393-399.
- **Scharrer, E., 1928.** Untersuchung über das Zwischenhirn der Fische. *Z. Vergleich Physiol.* 7: 1-38.
- **Schulz, R.W., y Blum, V., 1990.** Steroid secretion of rainbow trout testis *in vitro*: variation during the reproductive cycle. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 80: 189-198.
- **Schulz, R.W., Schlaghecke, R., y Blum, V. 1985.** A particulate membrane preparation from ovaries of preovulatory rainbow trout (*Salmo gairdneri*): binding studies with ¹²⁵I-human chorionic gonadotropin. *Comp. Biochem. Physiol. A* 82: 429-433.
- **Schulz, R.W., Van der Corput, L., Janssen-Dommerholt, J., y Goos, H.J.Th., 1993.** Sexual steroids during puberty in male African catfish (*Clarias gariepinus*): serum levels and gonadotropin-stimulated secretion *in vitro*. *J. Comp. Physiol.*, 164: 195-205.
- **Schulz, R.W., Vischer, H.F., Cavaco, J.E., Santos, E.M., Tyler, C.R., Goos, H.J., Bogerd, J. 2001.** Gonadotropins, their receptors, and the regulation of testicular functions in fish. *Comp. Biochem. Physiol. B*.129: 407-417.
- **Schwanzel-Fukuda M, Pfaff DW. 1989.** Origin of luteinizing hormone-releasing hormone neurons. *Nature* 338:161-164.
- **Schwanzel-Fukuda M. 1999.** Origin and migration of luteinizing hormone-releasing hormone neurons in mammals. *Microsc Res Tech.* 44: 2-10.
- **Sealfon, S.C., Weinstein, H., Millar, R.P., 1997.** Molecular mechanisms of ligand interaction with the gonadotropin-releasing hormone receptor. *Endocr. Rev.* 18, 180-205.
- **Senthilkumaran B, Okuzawa K, Gen K, Ookura T, Kagawa H. 1999.** Distribution and seasonal variation in levels of three native GnRHs in the brain and pituitary of perciform fish. *J. Neuroendocrinol.* 11: 181-186.
- **Seong, J.Y., Kang, S.S., Kam, K., Han, Y.G., Kwon, H.B., Ryu, K., Kim, K. 1998.** Differential regulation of gonadotropin releasing-hormone (GnRH) receptor expression in the posterior mediobasal hypothalamus by steroid hormones: implication of GnRH neuronal activity. *Brain. Res. Mol. Brain. Res.* 53: 226-235.
- **Sherwood, N., Eiden, L., Brownstein, M., Spiess, J., Rivier, J., Vale, W. 1983.** Characterization of a teleost gonadotropin-releasing hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 2794-2798.

- **Sherwood NM, Zoeller RT, Moore FL. 1986.** Multiple forms of gonadotropin-releasing hormone in amphibian brains. *Gen. Comp. Endocrinol.* 61:313-322.
- **Sherwood, N.M., y Coe, I.R., 1991.** Neuropeptides and their gene in fish. *En: Proc. of the Fourth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish.* Scott, A.P., Sumpter, J.P., Kime, D.E., y Rolfe, M.S., Eds. *Fish Symp.* 91, Sheffield. pp. 38-40.
- **Sherwood, N. M., Lovejoy, D. A. y Coe, I.R., 1993.** Origin of non-mammalian gonadotropin-releasing hormones. *Endocrine Rev.*, 14: 241-254.
- **Shibata, N., Yoshikuni, M., y Nagahama, Y. 1991.** Effects of hormones on vitellogenin incorporation into oocytes of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) *in vitro*. *Zool. Sci.* 8: 1071.
- **Silversand, C., Hyllner, S.J., y Haux., C., 1993.** Isolation, immunochemical detection and observations of the instability of vitellogenin from four teleosts. *J. Exp. Zool.*, 267:
- **Silverstein, J.T., Breininger, J., Baskin, D.G., Plisetskaya, E.M. 1998.** Neuropeptide Y-like gene expression in the salmon brain increases with fasting. *Gen. Comp. Endocrinol.* 110:157-165.
- **Sloley, B.D., Kah, O., Trudeau, V.L., Dulka, J.G., Peter, R.E. 1992.** Amino acid neurotransmitters and dopamine in brain and pituitary of the goldfish: involvement in the regulation of gonadotropin secretion. *J. Neurochem.* 58: 2254–2262.
- **Smith, D.F., y Toft, D.O., 1993.** Steroid receptors and their associated proteins. *Mol. Endocrinol.*, 93: 4-11.
- **Sohn, Y.C., Yoshiura, Y., Kobayashi, M., Aida, K. 1999.** Seasonal changes in mRNA levels of gonadotropin and thyrotropin subunits in the goldfish, *Carassius auratus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 113: 436-44.
- **Somoza, G. M., y Peter, R. E. 1991.** Effects of serotonin on gonadotropin and growth hormone release from *in vitro* perfused goldfish pituitary fragments. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 82: 103-110. Expression of pejerrey gonadotropin-releasing hormone in three orders of fish. *Biol. Reprod.* 67: 1864-1871.
- **Sower, S.A., Chiang, Y.C., Lovas, S., Conlon, J.M. 1993.** Primary structure and biological activity of a third gonadotropin-releasing hormone from lamprey brain. *Endocrinology* 132: 1125-1131.
- **Suzuki, K., Kawauchi, H. y Nagahama.Y. 1988a.** Isolation and characterization of two distinct gonadotropins from chum salmon pituitary glands. *Gen. Comp. Endocrinol.* 71: 292-301.
- **Suzuki, K., Kawauchi, H. y Nagahama.Y. 1988b.** Isolation and characterization of subunits from two distinct salmon gonadotropins. *Gen. Comp. Endocrinol.* 71: 302-306.
- **Suzuki, K., Nagahama, Y. y Kawauchi, H. 1988c.** Steroidogenic activities of two distinct salmon gonadotropins. *Gen. Comp. Endocrinol.* 71: 452-458.
- **Suzuki, K., Kanamori, A., Nagahama.Y. y Kawauchi, H. 1988d.** Development of salmon GtH I and GtH II radioimmunoassays. *Gen. Comp. Endocrinol.* 71: 459-467.
- **Swanson, P. 1991.** Salmon gonadotropins: Reconciling old and new ideas. *En: Proc.of the Fourth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish* (A.P. Scott, J.P. Sumpter, D.E. Kime & M.S. Rolfe, Eds.). *Fish Symp.* 91. Sheffield. 2-7.

- **Swanson, P., Bernard, M., Nozaki, M., Suzuki, K., Kawauchi, H., y Dickhoff, W.W., 1989.** Gonadotropins I and II in juvenile coho salmon. *Fish Physiol. Biochem.*, 7: 169-176.
- **Swanson, P., Suzuki, K., Kawauchi, H., Dickhoff, W.W., 1991.** Isolation and characterization of two coho salmon gonadotropins, GTH I and GTH II. *Biol. Reprod.*, 44: 29-38.
- **Swanson, P., y Dickey, J.T. 1996.** Regulation of gonadotropin I by sex steroids and gonadotropin releasing hormone in coho salmon. *En 3rd International Symposium on Fish Endocrinology.* Hakodate, pp. 65.
- **Tatemoto, K. 1982.** Neuropeptide Y: complete amino acid sequence of the brain peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79:5485-5489.
- **Thomas, P., y Trant, J.M.P., 1989.** Evidence that 17α , 20β , 21 trihydroxy-4-pregnen-3-one is a maturation inducing steroid in spotted seatrout. *Fish Physiol. Biochem.* 7: 185-191.
- **Trant, J.M. y Thomas, P. 1989.** Isolation of a novel maturation-inducing steroid produced *in vitro* by ovaries of Atlantic croacker. *Gen. Comp. Endocrinol.* 75: 397-404.
- **Troskie, B., Illing, N., Rumbak, E., Sun, Y.M., Hapgood, J., Sealfon, S., Conklin, D., Millar, R. 1998.** Identification of three putative GnRH receptor subtypes in vertebrates. *Gen. Comp. Endocrinol.* 112: 296-302.
- **Trudeau, V.L., Sloley, B.D., Wong, A.O.L., Peter, R.E., 1991.** Mechanism of sex steroids negative and positive feedback control of gonadotropin release (GTH) secretion in teleost. *En Proc. of the Fourth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish.* Scott, A.P., Sumpter, J.P., Kime, D.E., y Rolfe, M.S., Eds. *FishSymp 91. Sheffield.* pp.224-226.
- **Trudeau, V.L., Sloley, B.D., Wong, A.O.L., Peter, R.E., 1993.** Interactions of gonadal steroids with brain dopamine and gonadotropin-releasing hormone in the control of Gonadotropin-II secretion in the goldfish. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 89: 39-50.
- **Trudeau, V.L. 1997.** Neuroendocrine regulation of gonadotrophin II release and gonadal growth in the goldfish, *Carassius auratus*. *Rev. Reprod.* 2: 55-68.
- **Tyler, C.R., 1991.** Vitellogenesis in salmonids. *En Proc. of the Fourth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish.* Scott, A.P., Sumpter, J.P., Kime, D.E., y Rolfe, M.S., Eds. *FishSymp 91. Sheffield.* pp. 295-299.
- **Ueda, H., y Hirashima, T. 1979.** On two different types of putative gonadotropins in the pituitary gland of the masu salmon, *Oncorhynchus masou*. *Annot. Zool. Japon.* 52: 114-124.
- **Ueda, H., Young, G., Crim, L.W., Kambegawa, A. y Nagahama, Y. 1983.** 17α , 20β -Dihydroxi-4-pregnen-3-one: plasma levels during sexual maturation and *in vitro* production by the testes of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*) and rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 51: 106-112.
- **Vacher, C., Mananos, E.L., Breton, B., Marmignon, M.H., Saligaut, C. 2000.** Modulation of pituitary dopamine D1 or D2 receptors and secretion of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone during the annual reproductive cycle of female rainbow trout. *J. Neuroendocrinol.* 12: 1219-1226.
- **Valotaire, Y., Le Roux, M.-G. y Jégo, P. 1993.** Estrogen receptor gene: structure and expression in rainbow trout. *En Biochemistry and Molecular Biology of Fishes.* vol 2, pp 373-390..

- **Van Bohemen, C.G., Lambert, J.G.D. y Peute, J. 1981.** Annual changes in plasma and liver in relation to vitellogenesis in the female rainbow trout, *Salmo gairdneri*. Gen. Comp. Endocrinol. 44: 94-107.
- **Van Der Kraak, G. 1983.** An introduction to gonadotropin receptor studies in fish. En *Fish physiology*. Hoar, W.S., Randall, D.J. y Donaldson, E.M., Eds. Vol. IXA, pp. 405-441. Academic Press.
- **Van Der Kraak, G., 1992.** Mechanism by which calcium ionophore and phorbol ester modulate steroid production by preovulatory ovarian follicles. J. Exp. Zool. 262: 271-278.
- **Van Der Kraak, G., y Peter, R.E., 1987.** Concanavalin A separates two forms of maturational gonadotropin in goldfish. En *Proc. of the Third International Symposium on Reproductive Physiology of Fish*. Idler, D.R., Crim, L.W., y Walsh, J.W., Eds. Memorial Univ. Newfoundland. St. John's Newfoundland, Canadá. pp. 78.
- **Van Oordt, P. G. W., y Peute, J. 1983.** The cellular origin of the pituitary gonadotropins in teleosts. En: *Fish Physiology*. (Hoar, W.S., Randall, D.J. y Donaldson, E.M. Eds.). Academic Press, New York. IXA: 137-186.
- **Vetillard, A., Atteke, C., Saligaut, C., Jegou, P., Bailhache, T. 2003.** Differential regulation of tyrosine hydroxylase and estradiol receptor expression in the rainbow trout brain. Mol. Cell. Endocrinol. 199: 37-47.
- **Volkoff, H., Peter, R.E. 1999.** Actions of two forms of gonadotropin releasing hormone and a GnRH antagonist on spawning behavior of the goldfish *Carassius auratus*. Gen. Comp. Endocrinol. 116: 347-355.
- **Wallace, R. A., y Selman, K. 1981.** The reproductive activity of *Fundulus heteroclitus* females from Woods Hole, Massachusetts, as compared with more southern locations. Copeia 1981: 212-214.
- **Wallace, R.A., y Selman, K., 1990.** Ultrastructural aspects of oogenesis and oocyte growth in fish and amphibians. J. Electron. Micr. Tech., 16: 175-201.
- **Weil, C., Carre, F., Blaise, O., Breton, B., Le Bail, P.Y. 1999.** Differential effect of insulin-like growth factor I on in vitro gonadotropin (I and II) and growth hormone secretions in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) at different stages of the reproductive cycle. Endocrinology 140(5):2054-62.
- **Weltzien, F.A., Kobayashi, T., Andersson, E., Norberg, B., Andersen, O. 2003.** Molecular characterization and expression of FSHbeta, LHbeta, and common alpha-subunit in male Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). Gen. Comp. Endocrinol. 131: 87-96.

- **White SA, Kasten TL, Bond CT, Adelman JP, Fernald RD. 1995.** Three gonadotropin-releasing hormone genes in one organism suggest novel role for an ancient peptide. Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 92: 8363-8367.
- **Whiting, S.J., y Wiggs, A.J., 1978.** Effect of sexual maturation and estradiol-17 β on liver glycogen and tyrosine aminotransferase activity of brook trout *Salvelinus fontinalis* Mitchell. Comp. Biochem. Physiol., B 60: 463-465.
- **Yahalom D, Chen A, Ben-Aroya N, Rahimipour S, Kaganovsky E, Okon E, Fridkin M, Koch Y. 1999.** The gonadotropin-releasing hormone family of neuropeptides in the brain of human, bovine and rat: identification of a third isoform. FEBS Lett 463: 289-294.
- **Yamauchi, K., Kagawa, H., Ban, M., Kasahara, N., y Nagahama Y. 1984.** Changes in plasma estradiol-17 β and 17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one

levels during final oocyte maturation of the masu salmon *Oncorhynchus masou*. Bull. Jap. Soc. Scient. Fish. 50: 2137.

- **Yaron, Z., Gur, G., Melamed, P., Rosenfeld, H., Elizur, A., Levavi-Sivan, B. 2003.** Regulation of fish gonadotropins. Int. Rev. Cytol. 225:131-185.

- **York, W.S., Patiño, R., y Thomas, P., 1993.** Ultrastructural changes in follicle cell-oocyte associations during development and maturation of the ovarian follicle in Atlantic Croaker. Gen. Comp. Endocrinol., 92:402-418.

- **Yoo, M.S., Kang, H.M., Choi, H.S., Kim, J.W., Troskie, B.E., Millar R.P., Kwon, H.B. 2000.** Molecular cloning, distribution and pharmacological characterization of a novel gonadotropin-releasing hormone ([Trp⁸] GnRH) in frog brain. Mol. Cell. Endocrinol. 164: 197–204.

- **Yoshikuni, N., Shibata, N y Nagahama, Y. 1993.** Specific binding of [³H] 17 α , 20 β dihidroxi-4-pregnen-3-one to oocyte cortices of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish Physiol. Biochem. 11: 15-25.

- **Young, G., Crim, L.W., Kagawa, H., Kambegawa, A. y Nagahama, Y. 1983a.** Plasma 17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one levels during sexual maturation of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*): *in vitro* effects of salmon gonadotropin, steroids, and cyanoketone (and inhibitor of 3 β -hidroxy-⁵-steroid dehydrogenase). J. Exp. Zool. 224:265-275.

- **Young, G., Ueda, H., y Nagahama, Y. 1983b.** Estradiol-17 β and 17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one production by isolated ovarian follicles of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*) in response to mammalian pituitary and placental hormones and salmon gonadotropin. Gen. Comp. Endocrinol., 52: 329-335.

- **Yu, J. Y. L. y Shen, S. T. 1989.** Isolation of pituitary glycoprotein gonadotropins from the grass carp (*Ctenopharyngodon idell*). Fish Physiol. Biochem. 7: 177-183.

- **Yu, K.L. y Peter, R.E. 1990.** Alteration in gonadotropin-releasing hormone in discrete brain areas of male goldfish during spawning behaviour. Brain Res., 512:89-94

- **Yu, K. L., y Peter, R. E. 1992.** Adrenergic and dopaminergic regulation of gonadotropin-releasing hormone release from goldfish preoptic-anterior hypothalamus and pituitary *in vitro*. Gen. Comp. Endocrinol., 85: 136-146

- **Yu, K.L., Rosenblum, P.M., y Peter, R.E., 1991.** *In vitro* release of gonadotropin-releasing hormone from the brain preoptic-anterior hypothalamic region and pituitary of female goldfish (*Carassius auratus*). Gen. Comp. Endocrinol., 81: 256-267.

- **Yu, K.L., He, M.L., Chik, C.C., Lin, X.W., Chang, J.P., Peter, R.E. 1998.** mRNA expression of gonadotropin-releasing hormones (GnRHs) and GnRH receptor in goldfish. Gen. Comp. Endocrinol. 112: 303-11.

- **Zanuy, S., y Carrillo, M. 1987.** La reproducción de los teleósteos y su aplicación en acuicultura. En: *Reproducción en Acuicultura. (J. Espinosa de los Monteros, U. Labarta, Eds.) CAICYT. Madrid.* 1-131.

- **Zhang L, Wayne NL, Sherwood NM, Postigo HR, Tsai PS. 2000.** Biological and immunological characterization of multiple GnRH in an opisthobranch mollusk, *Aplysia californica*. Gen. Comp. Endocrinol. 118: 77-89.

- **Zohar, Y., Breton, B. y Fostier A. 1982.** Gonadotropic function during the reproductive cycle of the female rainbow trout, *Salmo gairdneri*, in relation to ovarian steroid secretion: *in vivo* and *in vitro* studies. *Proc. of the International*

Symposium on the Reproductive Physiology of Fish. Richter, C.J.J. y Goos, H.J.Th., Eds. Wageningen (The Netherlands). pp. 14-18.

- **Zohar, Y., Pagelson, G., y Tosky, M., 1988.** Daily changes in reproductive hormone levels in the female gilthead seabream *Sparus aurata* at the spawning period. En *Reproduction in fish-basic and applied aspects in endocrinology and genetics*. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris. pp. 119-125.

- **Zohar Y, Elizur A, Sherwood NM, Powell JF, Rivier JE, Zmora N. 1995.** Gonadotropin-releasing activities of the three native forms of gonadotropin-releasing hormone present in the brain of gilthead seabream, *Sparus aurata*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 97: 289-299.

- **Zohar, Y., Chow, M., Gothilf, Y., Kight, K., Hassin, S., Elizur, A., Muñoz-Cueto., J.A. and Kah, O. 1996.** Endocrine and molecular aspects of the multiple GnRHs present in perciform fish (seabream, striped bass). En *3rd International Symposium on Fish Endocrinology*. Hakodate, pp. 58.